

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : A61K 38/52, 39/395, 48/00, A61P 17/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/50070
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. August 2000 (31.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01822		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Februar 2000 (22.02.00)			
(30) Prioritätsdaten: 199 08 242.1 25. Februar 1999 (25.02.99) DE 199 34 458.2 27. Juli 1999 (27.07.99) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: POGGE VON STRANDMANN, Elke [DE/DE]; Moritzstrasse 14, D-44807 Bochum (DE).			
(74) Anwalt: SCHNEIDERS & BEHRENDT; Huestrasse 23, D-44787 Bochum (DE).			
Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>			

(54) Title: PREPARATION FOR THE TREATMENT OF PIGMENTATION DISORDERS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON PIGMENTIERUNGSSTÖRUNGEN

(57) Abstract

The invention relates to a preparation for the treatment of pigmentation disorders. Said preparation contains a physiologically active quantity of the DCoH protein, the DNA and/or RNA coding for said protein or DCoH antibodies or antiserum as active ingredient in a pharmaceutically suitable excipient. The invention also relates to the use of DCoH, the DNA and/or RNA coding for same or DCoH antibodies or antiserum as active ingredient in the production of such a preparation.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen, das eine physiologisch wirksame Menge des Proteins DCoH der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder DCoH-Antikörper oder -Antiserum als Wirkstoff in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial enthält, sowie die Verwendung von DCoH der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DCoH-Antikörpern oder -Antiserum als Wirkstoff zur Herstellung solch eines Mittels.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänen		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers unter Verwendung des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA als Wirkstoff.

Das Enzym DCoH ist der Dimerisierungscofaktor der HNF-1 homeodomänen Proteine (HNF-1 α und HNF-1 β). Durch diesen Mechanismus ist DCoH an der Kontrolle der Genexpression beteiligt, siehe D.B. Mendel et al., Science 254 (1991, 1762). Gleichzeitig ist das Protein als Pterin-4 α -carbinolamindehydhydratase PCD bekannt und an der Tetrahydrobiopterinregenerierung beteiligt, siehe B.A. Citron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, 11891. PCD greift dabei in die Biosynthese von L-Tyrosin aus L-Phenylalanin ein. In letzterem Cyclus ist PCD zusammen mit Phenylalaninhydroxylase eingebunden und an der Regenerierung von (6R)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin beteiligt. Unabhängig davon wird DCoH/PCD aber auch im vertebraten Ei, im pigmentierten Epithel des Auges, in der Haut und im Gehirn gefunden, siehe E. Pogge v. Strandmann und G.U. Ryffel, Development 121 (1995), 1217; E. Pogge v. Strandmann et al. Int. J. Dev. Biol. 42 (1998), 53.

Nach ersten Daten über die Reinigung und Klonierung von DCoH von D.B. Mendel et al, Science 254 (1991), 1762 wurde so wohl die Peptidsequenz als auch die dafür codierende Nukleinsäuresequenz von Human-, Maus- und Ratten-DCoH in US-A 5 403 712 und 5 620 887 erstmalig beschrieben. Bezuglich aller relevanter Strukturdaten wird auf diese Veröffentlichungen verwiesen. DCoH/PCD hat sich als mehr oder weniger universelles Prinzip in der Entwicklung von Wirbeltieren, insbesondere auch für die Frühentwicklung

erwiesen. Es weist sowohl katalytische wie regulierende Eigenschaften auf und ist in einer größeren Anzahl von Zelltypen präsent. In einigen dieser Zelltypen ist es mit den nuklearen Transkriptionsfaktoren HNF-1 α und HNF-1 β verschwistert, in anderen in den Phenylalaninhydroxylase-Enzymkomplex eingebunden. Das Vorkommen von DCoH/PCD in Zelltypen in Abwesenheit von HNF-1 oder Phenylalaninhydroxylase weist darauf hin, daß das Protein auch mit davon verschiedenen zellulären Partnern zusammenwirkt.

Eine bekannte Pigmentierungsstörung ist beispielsweise Vitiligo. Vitiligo zeichnet sich durch weiße, pigmentfreie, meist langsam größer werdende

Flecke mit hyperpigmentiertem Rand aus und wird auf eine Hemmung der Melaninsynthese zurückgeführt. Die Erscheinung kann in Verbindung mit anderen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, auftreten. Eine ursächliche Behandlung ist bislang nicht möglich. Vitiligo scheint mit einem DcoH-Mangel einherzugehen.

Andere Depigmentierungsstörungen sind beispielsweise Formen von Canities, also Grauhaarigkeit, sowohl in der vorzeitigen wie der im höheren Alter auftretenden physiologischen Form. Auch hier sind ursächliche Therapien nicht bekannt.

Eine Erkrankung, die mit Depigmentierungerscheinungen verbunden ist, ist

Alopecia areata, ein lokaler, plötzlich einsetzender und ursächlich unklarer Haarausfall, insbesondere auch der Kopfhaare. Bei diesem Haarausfall bleiben die Haarfollikel erhalten; es kommt zu spontanen Remissionen, bei denen die betroffenen Haare (zunächst) weiß nachwachsen. Die Erkrankung ist also mit einer Pigmentierungsstörung verbunden.

Ferner sind das Usher- und das Waardenburg-Syndrom mit Pigmentierungsstörungen verbunden. Darüber hinaus sind zahlreiche Störungen bekannt, die mit einer (lokalen) Überpigmentierung verbunden sind.

Bei den vorstehend genannten Erscheinungen und Erkrankungen sind die Wirkungen eingehend beschrieben, ohne daß aber die Ursachen geklärt werden

konnten. Die Vermutung, daß das Peptid DCoH/PCD dabei eine Rolle spielen

könnte, wurde in Bezug auf Vitiligo geäußert, jedoch nicht bewiesen. Tatsächlich deutet vieles darauf hin, daß die beobachtete Verminderung der enzymatischen Aktivität von DCoH bei milden Formen von Hyperphenylalaninämie und Vitiligo eine Folge und nicht die Ursache für diese Störungen ist.

5 Nachgewiesen wurde in den betroffenen Zellen ein Überangebot des für die Bildung von L-Tyrosin aus L-Phenylalanin notwendigen Cofaktors Tetrahydrobiopterin.

Insgesamt besteht ein Bedarf an Mitteln, die geeignet sind, Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers und damit verwandter 10 Erscheinungen zu behandeln.

Es wurde jetzt überraschend gefunden, daß DCoH/PCD geeignet ist, de novo pigmentierte Zellen zu schaffen. Dabei ist DCoH nicht Glied in der Kette der Melaninsynthese, dessen Ausfall zur Depigmentierung führt, sondern es findet 15 eine "künstliche Überexpression" statt, die die Pigmentierung auslöst. Es wurde ferner gefunden, daß DcoH-Antiserum geeignet ist, eine Pigmentierung abzuschwächen oder (deren Entstehung) zu verhindern.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen, bei dem eine physiologisch wirksame Menge des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DcoH-Antikörpern 20 als Wirkstoff in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial enthalten ist.

Das erfindungsgemäße Mittel enthält das die Pigmentierung auslösende Protein DCoH oder, alternativ oder ergänzend, die dafür codierende DNA und/oder RNA oder alternativ, DcoH-Antikörper bzw. -Antiserum als Wirkstoff.

25 Experimentell wurde der Effekt von DCoH/PCD nach der Injektion von mRNA in Oocyten gezeigt. Da die RNA in der Zelle das Produkt der Transkription der entsprechenden DNA ist, und selbst in das Protein übersetzt wird, ist die Wirksamkeit aller drei Wirkstoffe, Protein, DNA und RNA, sichergestellt, wobei gewisse Spektren bei der Stärke und Dauer der Wirkung auftreten können. 30 Protein- und Nuklein-Säure-Sequenz von DCoH und der dafür codierenden

DNA sind in US-A 5 403 712 und 5 620 887 beschrieben. Die Herstellung von Antiserum ist in Development 121, 1217 (1995) beschrieben. Im einzelnen kommen sowohl poly- wie auch monoklonale Antikörper für die erfindungsgemäßen Zwecke in Frage.

5 Das erfindungsgemäße Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen enthält den Wirkstoff in einem üblichen pharmazeutisch annehmbaren und verträglichen Trägermaterial. Solche Trägermaterialien sind sowohl für die topische als auch die parenterale Verabreichung bekannt. Möglich sind ferner gentherapeutische Verabreichungsformen, bei denen das für DCoH 10 decodierende Gen in die Zielzelle eingeführt wird. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf dem Gebiet der Protein/DNA/RNA-Therapie üblich und orientieren sich an den in den Zielzellen normalen Konzentrationen, d. h. liegen auf normaler Höhe oder darüber.

Bei der topischen Verabreichung kann das Mittel auf die Haut aufgebracht 15 werden, wobei der Wirkstoff in einem transdermal wirksamen Trägermaterial enthalten ist. Solche Trägermaterialien, die hier als Penetrationshilfe oder Penetrationsbeschleuniger ausgebildet sind und meist in Form von Liposomen vorliegen, sind bekannt. Des weiteren ist das Aufbringen mittels eines transdermalen Systems möglich und insbesondere bei der Behandlung lokaler 20 Störungen sinnvoll.

Bei der topischen Anwendung, die sich auf bestimmte Regionen oder Zellen richtet, beispielsweise bei überpigmentierten oder depigmentierten Hautpartien oder Bereichen der Behaarung, empfiehlt sich insbesondere die Verwendung von hierfür entwickelten Liposomen, wie sie von R.M. Hoffman in Journal of 25 Drug Targeting, Vol. 5 (1997), 67 beschrieben sind. Hoffman beschreibt die Haarfollikel-selektive Einbringung von Makromolekülen bishin zum aktiven Gen mit einem Zielsystem auf Basis von topisch angewendeten Liposomen auf Phosphatylcholinbasis. Das System ist anwendbar auf in Liposomen eingebrachte oder daran gebundene Melanine, Proteine, Gene und dergleichen.

30 Kationische Lipide für die intrazelluläre Abgabe von biologisch aktiven Molekülen sind ferner aus WO-A 91/16024 bekannt, wobei diese kationischen Lipide

für die topische, enterale wie auch parenterale Verabreichung von Wirkstoffen verwandt werden können.

In vielen Fällen kann es sinnvoll sein, den Wirkstoff systemisch zur Verfügung zu stellen, wie beispielsweise aus der Interferon-Therapie der multiplen 5 Sklerose oder auch zur Behandlung von Diabetes bekannt. Diese Therapien beruhen auf der gleichmäßigen Verteilung des Wirkstoffs im Körper und der dadurch ausgelösten Wirkung. Der Wirkstoff kann dabei als solcher oder auch modifiziert eingesetzt werden, d.h. in Formen, die den eigentlichen Wirkstoff erst am Zielort freisetzen. Suspensionen für die parenterale Verabreichung 10 enthalten den Wirkstoff zweckmäßigerweise ebenfalls gebunden an- oder eingeschlossen in Liposome als Transfermedium und suspendiert in einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit.

Eine weitere systemische Darreichungsform ist beispielsweise in Form eines Nasalsprays, das den Wirkstoff auf die Schleimhäute bringt und über diese an 15 den Körper abgibt.

Eine weitere Verabreichungsmöglichkeit ist die Implantation von pro- oder eukaryotischen Organismen oder den Wirkstoff enthaltenen Trägermaterialien, welche den Wirkstoff kontinuierlich oder reguliert sezernieren.

Schließlich sei auf die Möglichkeiten der Gentherapie verwiesen, d.h. die 20 Einlagerung des Gens für DCoH/PCD in eine Zielzelle mittels DNA- oder RNA-Viren, die sich in das Genom integrieren und damit das Gen stabil einführen. Das Gen unterliegt dann der normalen Transkription und Translation in der Zelle und stellt damit eine sinnvolle Alternative zur transienten Transfektion mit dem 25 Protein oder der dafür codierenden DNA oder RNA dar. Die Viren können sich dabei lokal einlagern - siehe auch die p53-Defizienz von Melanomen - oder sich ungerichtet im Körper verbreiten. Im Stand der Technik sind hierzu modifizierte Adenoviren oder andere "Erkältungsviren" beschrieben, die als geeignete Vehikel in Frage kommen. Zur Ausschaltung einer Hyperpigmentierung können Antisense-Techniken eingesetzt werden.

Es versteht sich, daß das Protein bzw. die dafür codierende DNA und/oder RNA zur Lagerung und Vermeidung von vorzeitiger Wirkungsminderung stabilisiert werden kann. Die Stabilisierung kann durch Beimischung üblicher Zusätze erreicht werden, so z. B. Puffersubstanzen, Salzen anderer Proteine wie auch von DNA und RNA erreicht werden. Aus der molekularen Biochemie sind hierzu beispielsweise Albumin, Heringssperma, DNA, tRNA bekannt, wie auch Detergenzien (ThesitR, TritonR), Alkali- und Erdalkaliionen und dergleichen. Eine Lagerung des Mittels und/oder Wirkstoffs in getrockneter oder gefriergetrockneter Form oder nach Schockfrieren im flüssigem Stickstoff kann ebenfalls sinnvoll sein.

Das erfindungsgemäße Mittel kann den Wirkstoff selbstverständlich in modifizierter Form enthalten, d.h. als Protein, in dem einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind oder fehlen. Ebenso können in der DNA und/oder RNA Nukleotide oder Nukleotidsequenzen fehlen, ergänzt oder ausgetauscht werden. Voraussetzung ist, daß der so modifizierte Wirkstoff die von ihm verlangte Wirkung bei der Behandlung von Depigmentierungerscheinungen nach wie vor liefert. Gründe für solche Modifikationen können die Stabilisierung des Wirkstoffs, produktionstechnische oder formulierungstechnische Gründe oder auch eine Verbesserung der Wirkung oder des Wirkungsspektrums sein. In Frage kommen Mutation und Fusion nach gentechnischen oder chemischen Methoden, Fusionierungen mit N- und C-terminalen Proteinen oder Peptiden. Aus Gründen einer besseren Reinigung mittels Affinitätschromatographie können beispielsweise Histidintags oder Gst-Fusionen vorgenommen werden, oder Sequenzen eingefügt werden, um eine Dirigierung in bestimmte Zielzellen zu erleichtern - NLS-Sequenzen sind geeignet, den Wirkstoff in den Zellkern zu dirigieren. Durch Phosphorylierung oder Glykosilierung an geeigneten Resten, Modifikationen an der Phosphatgruppe der DNA oder RNA können Modifikationen vorgenommen werden, die dem Abbau durch körpereigene Nukleasen vorbeugen. Bekannt sind hier Phosphorthioatgruppen.

Zur Stabilisierung des Proteins kann es sinnvoll sein, Änderungen vorzunehmen, etwa bereits auf der Ebene der DNA/RNA, um beispielsweise Restriktionsstellen, chemische Instabilität oder Angriffspunkte von Nukleasen zu beseitigen oder die Wirkung zu verstärken oder zu spezifizieren, beispielsweise

auch, um zwischen den verschiedenen Aktivitäten des multifunktionellen Proteins zu diskriminieren und eine störende Funktion stillzulegen. Umgekehrt kann es auch sinnvoll sein, die Stabilität zu vermindern und damit die Halbwertszeit des Wirkstoffs zu verkürzen, indem Modifikationen eingeführt werden, die den protolytischen Abbau ermöglichen, etwa durch Einbau von Erkennungssequenzen für Proteasen.

Das Protein kann auf übliche Weise nach Klonierung des Gens in geeignete Vektoren rekombinant aus Bakterien oder Eukaryonten isoliert werden. Die DNA und RNA kann aus Bakterien oder Eukaryonten nach Standardmethoden erhalten werden.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Behandlung von Pigmentationsstörungen enthält den Wirkstoff in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial, das einerseits aus mehreren üblichen Bestandteilen bestehen kann. Zweckmäßigerweise enthält das Trägermaterial wiederum ein für den Wirkstoff geeignetes Transfermedium, insbesondere ein Liposom oder Virus. Das Mittel ist in erster Linie für die topische oder parenterale Verabreichung bestimmt.

Die Erfindung betrifft neben einem Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen auch die Verwendung von DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DCoH-Antikörpern bzw. -Antiserum als Wirkstoff zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers. Insbesondere werden unter Pigmentierungsstörungen Depigmentierungerscheinungen solche der Haut, Haare und der Retina verstanden, darunter insbesondere Vitiligo, Alopecia areata, sowie das vorzeitige oder altersbedingte Ergrauen des Haarwuchses und Formen von lokaler Überpigmentierung, etwa Melanodermie, Naevus und dergleichen. Die Erfindung betrifft sowohl angeborene wie erworbene Pigmentierungsstörungen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der erfindungsgemäßen DCoH, dafür kodierende DNA und/oder RNA oder DCoH-Antikörper oder -Antiserum enthaltenden Mittel liegt in der Behandlung von melanozytären Tumoren.

Melanozytäre Tumore und insbesondere auch das maligne Melanom stellen dedifferenzierte Melanozyten aus klonalem Ursprung dar.

Die Wirkung der erfindungsgemäßen Mittel auf melanozytäre Tumore geht in zweierlei Richtung. Zum einen beruht sie auf der Redifferenzierung von dedifferenzierten Melanozyten. Versuche an Xenopusoocyten haben gezeigt, daß DCoH die Differenzierung von Melanozyten einleitet. Die Anwendung der erfindungsgemäßen Mittel wirkt somit in Richtung auf eine Redifferenzierung und Normalisierung entarteter Zellen.

Zum anderen kann über Antikörper, Antiserum oder Antisense-RNA, gegebenenfalls auch über geeignete Mutanten der DCoH-DNA, -RNA oder des Proteins selbst, Einfluß auf die Teilung der Melanozyten genommen werden. Über die Blockierung der Wirkung des DCoH kann Einfluß auf die Teilungsgeschwindigkeit der Melanozyten bis hin zum Stillstand der Teilung und gegebenenfalls sogar zum Absterben der Zellen genommen werden.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert, wobei hinsichtlich der Materialien und Methoden ergänzend auf E. Pogge von Strandmann und G.U. Ryffel, Development 121 (1995), 1217 bis 1226 hingewiesen wird.

Beispiel 1:

Frösche der Gattung *Xenopus* wurden unter Standardbedingungen gehalten. Zur in vitro Befruchtung wurden 600 U Chorion Gonadotropin (Human) subkutan in den dorsalen Lymphsack geschlechtsreifer Weibchen injiziert und die Eier nach der Eiablage in Petrischalen mit intakten Spermien befruchtet. Nach 5 Minuten wurde mit 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 5 mM Hepes pH 7,8 und 2,5 mM NaHCO₃ überschichtet.

Für die Mikroinjektion wurde die Gallerthüle entfernt und dann 1,5 Minuten mit 2 % Cystein bei pH 8,0 behandelt, anschließend in Überschichtungspuffer

dreifach gewaschen. Nach der Injektion wurde bei Raumtemperatur in Überschichtungspuffer kultiviert.

5 Für die Injektion wurde durch in vitro Transkription aus geeigneten rekombinanten Vektoren gewonnene mRNA verwandt. Pro Ei wurden 500 pg/RNA in 25 nl Pufferlösung injiziert. Die dazu verwandten Glaskanülen wurden vor der Verwendung aus Kapillaren gezogen und hatten an der Spitze einen Durchmesser von nicht mehr als 30 μ m.

10 Die sich aus den Eiern entwickelten Embryos zeigten eine deutliche Pigmentierung, die sich früher einstellte, als bei der Kontrolle. Die Pigmentierung trat zudem an Stellen auf, an denen der Embryo normalerweise nicht pigmentiert ist.

Fig. 1 zeigt Embryonen, die in der linken Bildreihe (A/C) DCoH überexprimieren. Auf der rechten Bildreihe (B/D) befindet sich die Kontrolle. Die dunklen Pigmentflecken sind in der linken Bildreihe deutlich zu erkennen. Es bezeichnen a = anima, eye = Auge, cg = cement glant.

15 DCoH/PCD induziert also ektopische Pigmentzellen. Das Ergebnis zeigt, daß DCoH/PCD allein, d.h. ohne die Melaninsynthekette, in der Lage ist, die für die Pigmentsynthese notwendigen Schritte auszulösen.

Beispiel 2:

20 In diesem Beispiel wird die RNA für DCoH in Xenopus-Embryonen im 2-Zellstadium in nur eine der beiden Zellen injiziert, zusammen mit der RNA für GFP, green fluorescent protein. Die Coinjektion der RNA für GFP diente der Visualisierung, daß die injizierten RNAs auch nur in den injizierten Zellen in aktives Protein translatiert werden.

25 In der sich aus dem zweiten Zellstadium entwickelnden Larven läßt Fig. 2 erkennen, daß die Pigmentierung auf eine Körperhälfte der Larve beschränkt ist, dort, wo auch die Fluoreszenz (rechte Bildreihe) sichtbar ist. DCoH/PCD ist somit geeignet, in den damit beaufschlagten Zellen eine vorzeitige und über das

normale Maß hinausgehende Pigmentierung auszulösen. Die Larven entwickelten sich, abgesehen von der Hyperpigmentierung und der Fluoreszenz normal.

Beispiel 3:

5 Nach Standardmethoden im Kaninchen gewonnenes Antiserum gegen DCoH wurde analog zu Beispiel 2 in Zellen von Fröschen der Gattung Xenopus injiziert. Fig. 3 zeigt, daß in drei Tage alten Embryonen die Pigmentbildung völlig unterdrückt ist (α -DcoH, oberes Bild), während in der Kontrolle (unteres Bild) die normale Pigmentierung auftritt.

Patentansprüche

1. Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers,

5 dadurch gekennzeichnet, daß es eine physiologisch wirksame Menge des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DcoH-Antikörpern oder -Antiserum, in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial enthält.

10 2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es das Protein DCoH enthält.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es DcoH-Antikörper enthält.

4. Mittel nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial ein den Wirkstoff transportierendes Transfermedium enthält.

15 5. Mittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transfermedium eine Liposomzubereitung oder ein Virus ist.

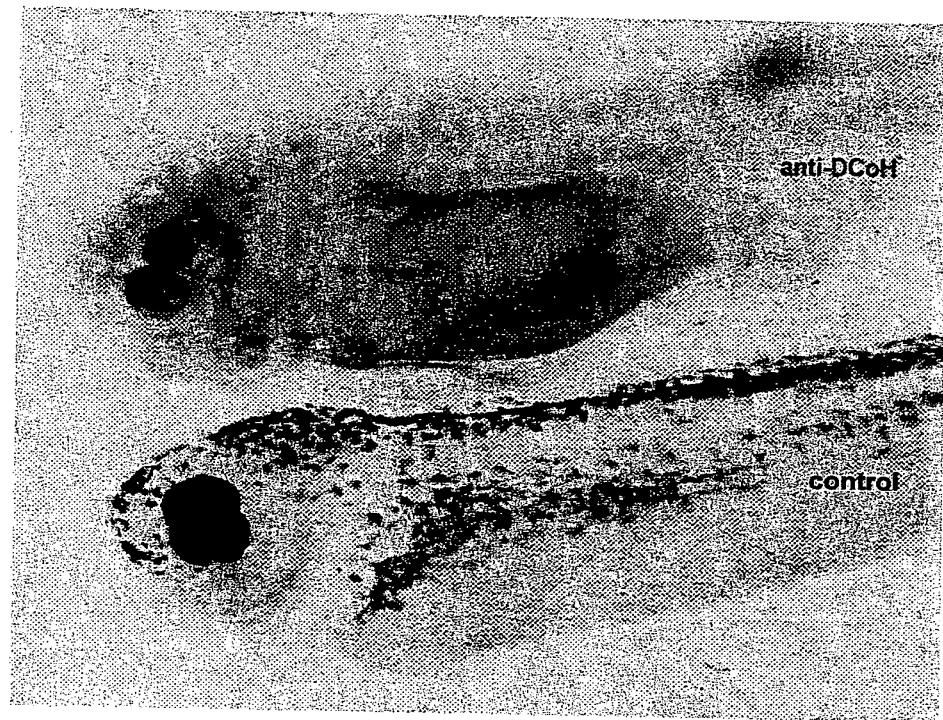
6. Mittel nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Formulierung zur topischen Anwendung vorliegt.

20 7. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Injektionsformulierung vorliegt.

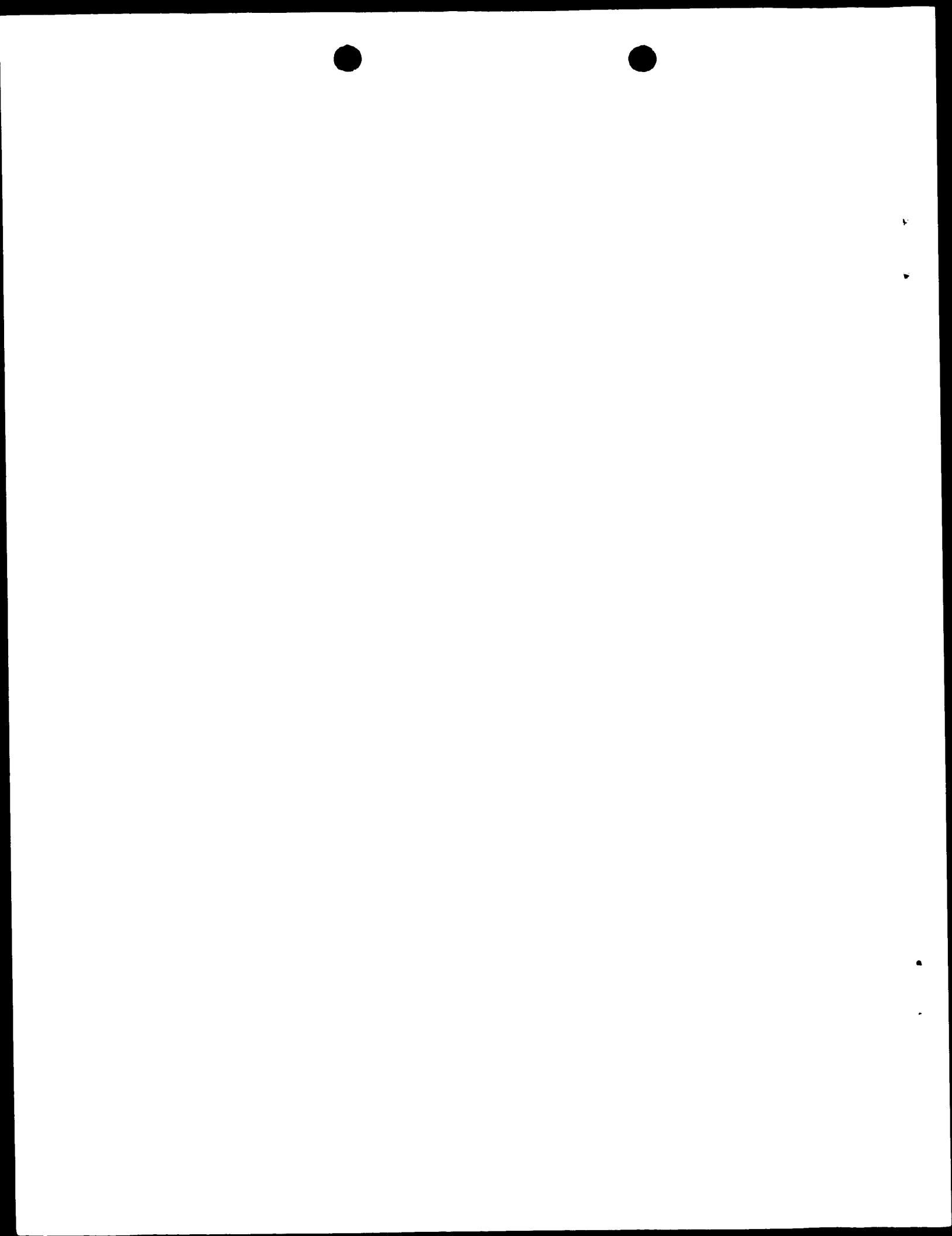
8. Mittel nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Pigmentierung oder Depigmentierung von Haut oder Haaren bestimmt ist.

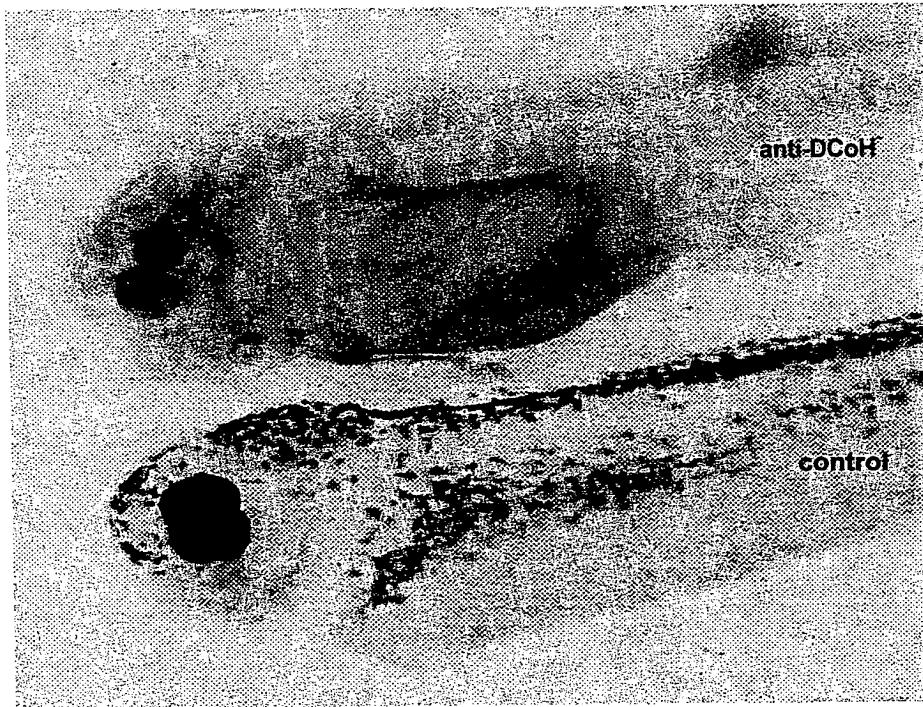
9. Mittel nach Anspruch 8, bestimmt zur Behandlung von Vitiligo,
5 Alopecia areata, und/oder Canities bzw. Melanodermie.

10. Verwendung des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA, oder von DcoH-Antikörpern bzw. -Antiserum, als Wirkstoff zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers.

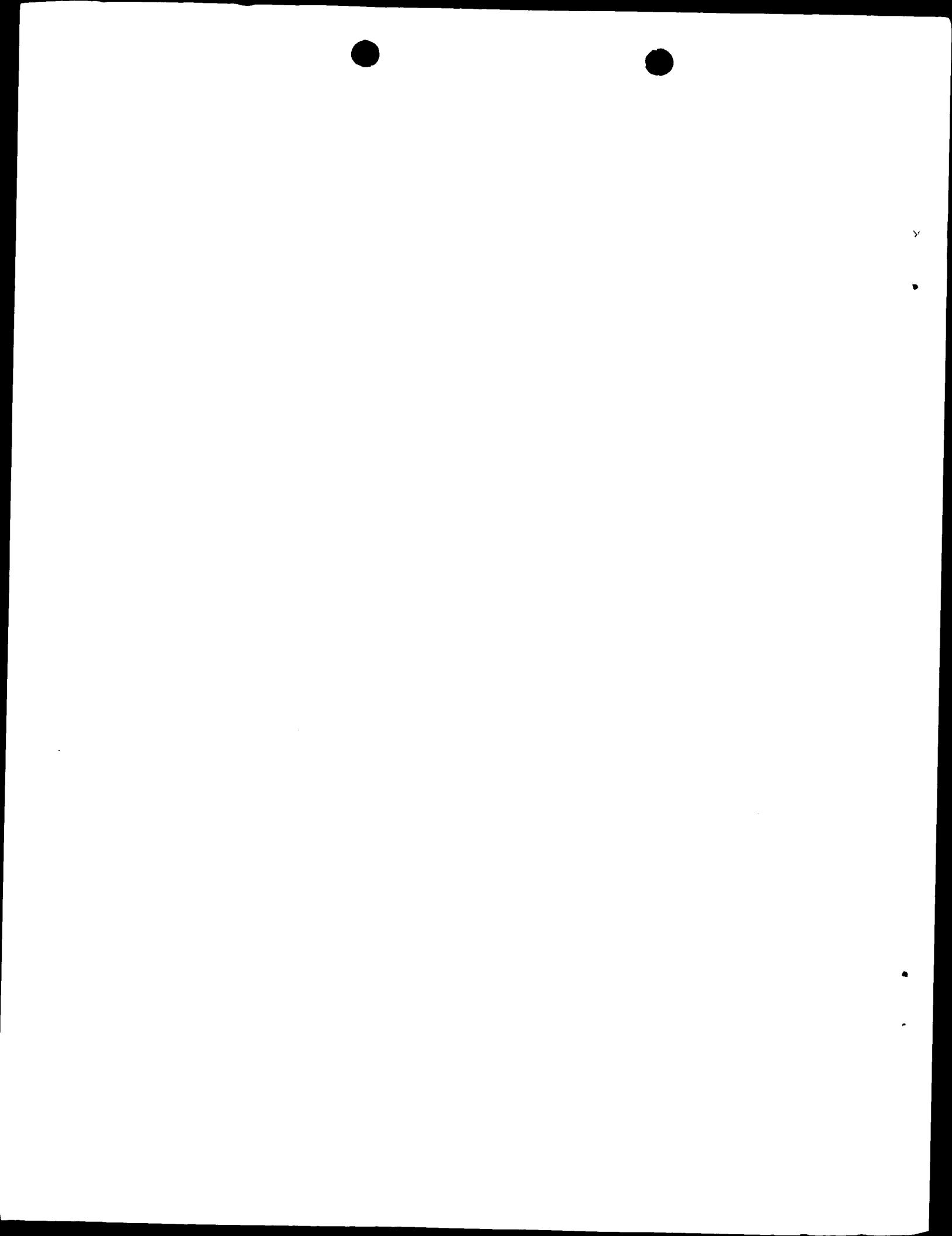


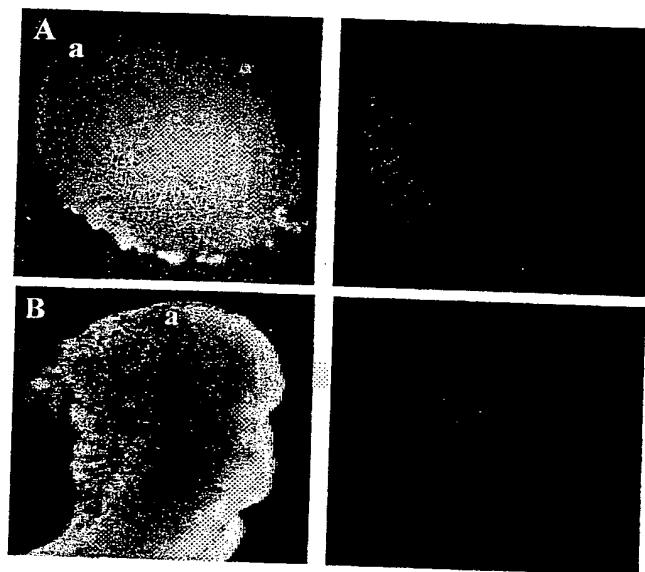
Figur 3



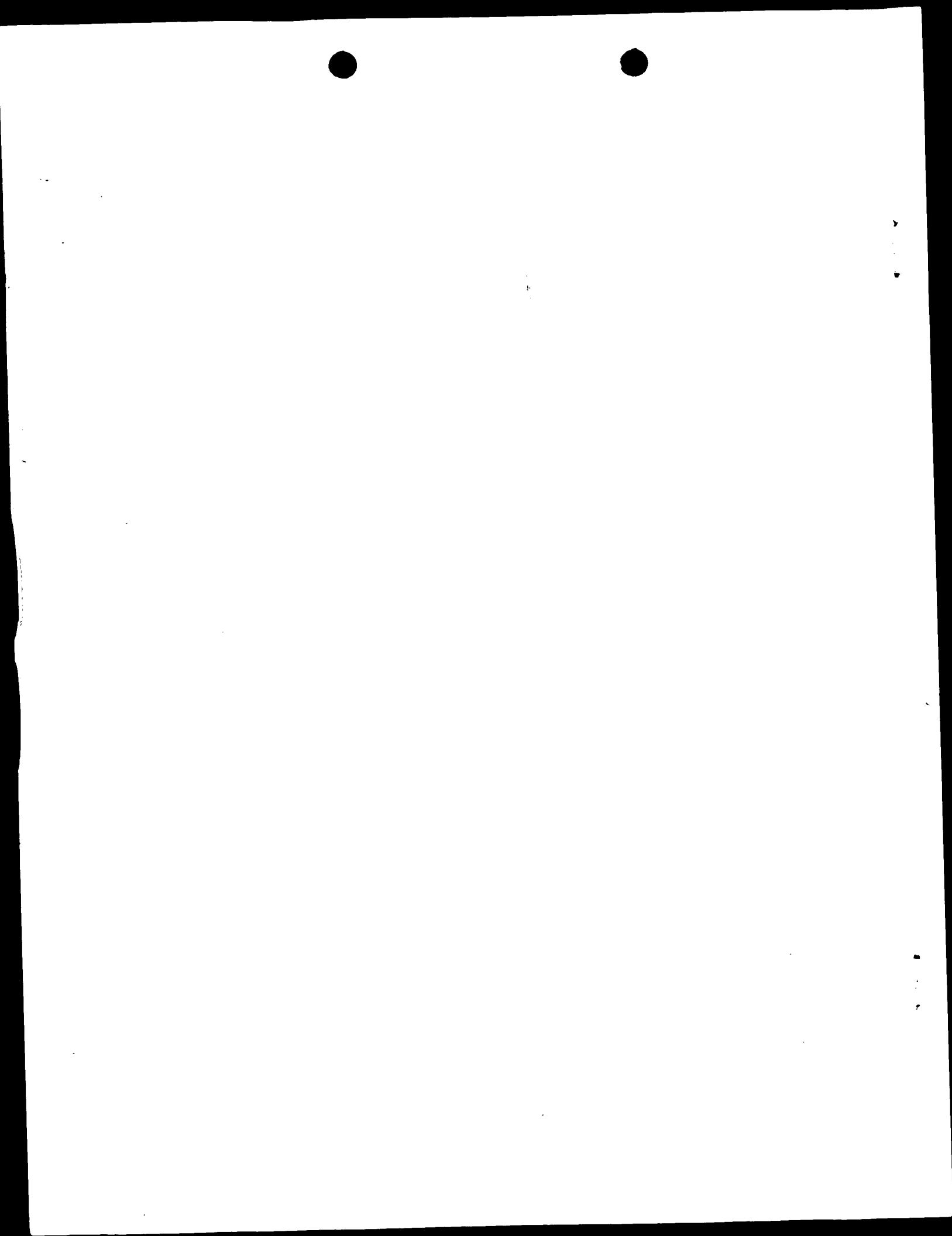


Figur 3





Figur 2



10/09/2008

10/09/2008

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/050070 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/52**,
39/395, 48/00, A61P 17/00, A61K 38/51

PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01822

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Februar 2000 (22.02.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 08 242.1 25. Februar 1999 (25.02.1999) DE
199 34 458.2 27. Juli 1999 (27.07.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: POGGE VON STRANDMANN, Elke
[DE/DE]; Moritzstrasse 14, D-44807 Bochum (DE).

(74) Anwalt: SCHNEIDERS & BEHRENDT; Huestrasse 23,
D-44787 Bochum (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches
Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 14. Dezember 2000

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten
Fassung: 28. November 2002

(15) Informationen zur Berichtigung:

siehe PCT Gazette Nr. 48/2002 vom 28. November 2002,
Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

RECEIVED

JAN 03 2003

TECH CENTER 1600/2900

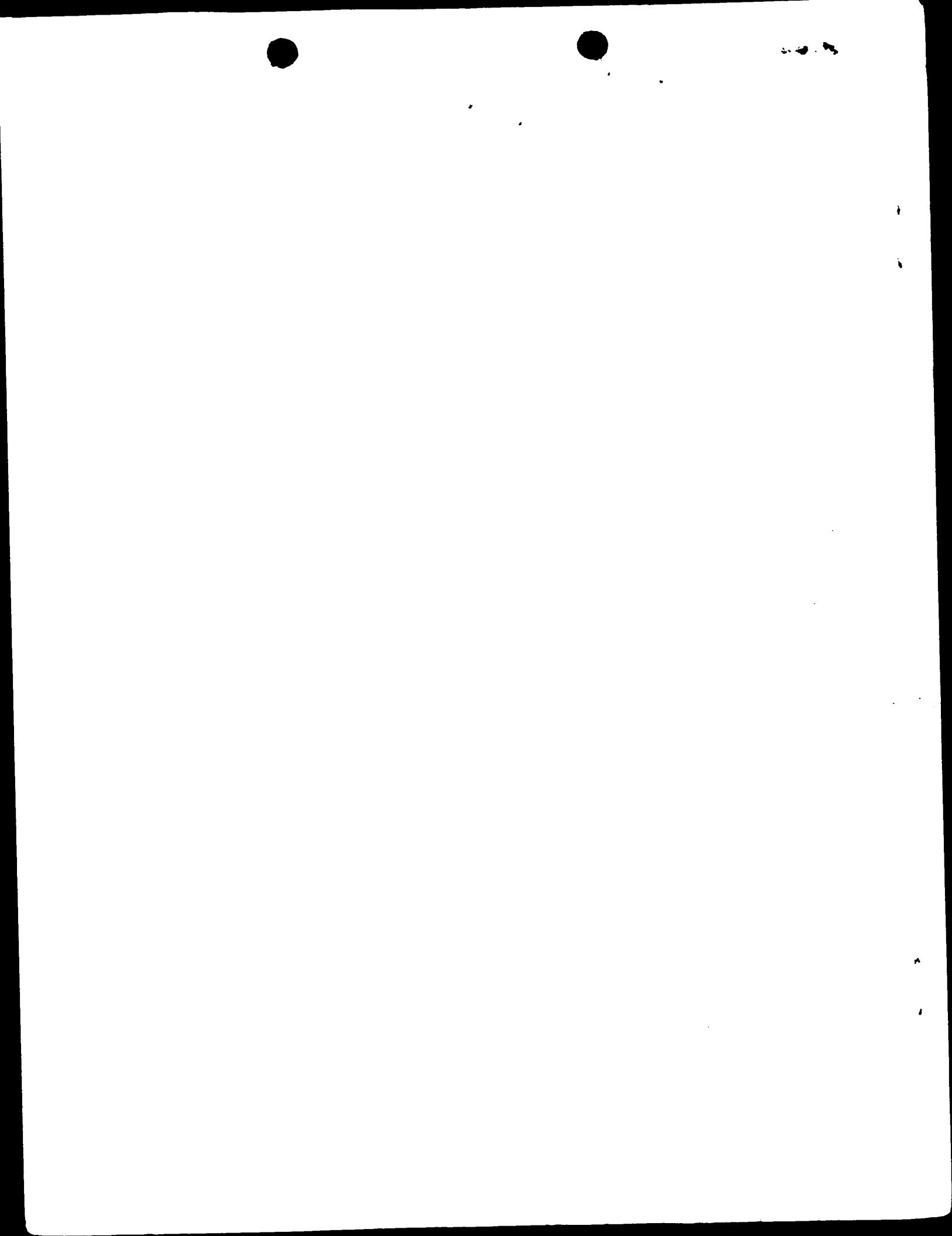
(54) Title: PREPARATION FOR THE TREATMENT OF PIGMENTATION DISORDERS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON PIGMENTIERUNGSSTÖRUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a preparation for the treatment of pigmentation disorders. Said preparation contains a physiologically active quantity of the DCoH protein, the DNA and/or RNA coding for said protein or DCoH antibodies or antiserum as active ingredient in a pharmaceutically suitable excipient. The invention also relates to the use of DCoH, the DNA and/or RNA coding for same or DCoH antibodies or antiserum as active ingredient in the production of such a preparation.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen, das eine physiologisch wirksame Menge des Proteins DCoH der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder DCoH-Antikörper oder -Antiserum als Wirkstoff in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial enthält, sowie die Verwendung von DCoH der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DCoH-Antikörpern oder -Antiserum als Wirkstoff zur Herstellung solch eines Mittels.

WO 00/050070 A3



Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen
5 des menschlichen und tierischen Körpers unter Verwendung des Proteins
DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA als Wirkstoff.

Das Enzym DCoH ist der Dimerisierungscofaktor der HNF-1 homeodomänen
Proteine (HNF-1 α und HNF-1 β). Durch diesen Mechanismus ist DCoH an der
Kontrolle der Genexpression beteiligt, siehe D.B. Mendel et al., Science 254
10 (1991, 1762). Gleichzeitig ist das Protein als Pterin-4 α -carbinolamindehydhydratase
PCD bekannt und an der Tetrahydrobiopterinregenerierung beteiligt, siehe
B.A. Citron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, 11891. PCD greift dabei
in die Biosynthese von L-Tyrosin aus L-Phenylalanin ein. In letzterem Cyclus ist
PCD zusammen mit Phenylalaninhydroxylase eingebunden und an der
15 Regenerierung von (6R)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin beteiligt. Unabhängig davon
wird DCoH/PCD aber auch im vertebraten Ei, im pigmentierten Epithel des
Auges, in der Haut und im Gehirn gefunden, siehe E. Pogge v. Strandmann und
G.U. Ryffel, Development 121 (1995), 1217; E. Pogge v. Strandmann et al. Int.
J. Dev. Biol. 42 (1998), 53.

20 Nach ersten Daten über die Reinigung und Klonierung von DCoH von D.B.
Mendel et al, Science 254 (1991), 1762 wurde so wohl die Peptidsequenz als
auch die dafür codierende Nukleinsäuresequenz von Human-, Maus- und
Ratten-DCoH in US-A 5 403 712 und 5 620 887 erstmalig beschrieben.
Bezüglich aller relevanter Strukturdaten wird auf diese Veröffentlichungen
25 verwiesen. DCoH/PCD hat sich als mehr oder weniger universelles Prinzip in
der Entwicklung von Wirbeltieren, insbesondere auch für die Frühentwicklung

erwiesen. Es weist sowohl katalytische wie regulierende Eigenschaften auf und ist in einer größeren Anzahl von Zelltypen präsent. In einigen dieser Zelltypen ist es mit den nuklearen Transkriptionsfaktoren HNF-1 α und HNF-1 β verschwistert, in anderen in den Phenylalaninhydroxylase-Enzymkomplex eingebunden. Das

5 Vorkommen von DCoH/PCD in Zelltypen in Abwesenheit von HNF-1 oder Phenylalaninhydroxylase weist darauf hin, daß das Protein auch mit davon verschiedenen zellulären Partnern zusammenwirkt.

Eine bekannte Pigmentierungsstörung ist beispielsweise Vitiligo. Vitiligo zeichnet sich durch weiße, pigmentfreie, meist langsam größer werdende

10 Flecke mit hyperpigmentiertem Rand aus und wird auf eine Hemmung der Melaninsynthese zurückgeführt. Die Erscheinung kann in Verbindung mit anderen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, auftreten. Eine ursächliche Behandlung ist bislang nicht möglich. Vitiligo scheint mit einem DcoH-Mangel einherzugehen.

15 Andere Depigmentierungsstörungen sind beispielsweise Formen von Canities, also Grauhaarigkeit, sowohl in der vorzeitigen wie der im höheren Alter auftretenden physiologischen Form. Auch hier sind ursächliche Therapien nicht bekannt.

Eine Erkrankung, die mit Depigmentierungerscheinungen verbunden ist, ist

20 Alopecia areata, ein lokaler, plötzlich einsetzender und ursächlich unklarer Haarausfall, insbesondere auch der Kopfhaare. Bei diesem Haarausfall bleiben die Haarfollikel erhalten; es kommt zu spontanen Remissionen, bei denen die betroffenen Haare (zunächst) weiß nachwachsen. Die Erkrankung ist also mit einer Pigmentierungsstörung verbunden.

25 Ferner sind das Usher- und das Waardenburg-Syndrom mit Pigmentierungsstörungen verbunden. Darüber hinaus sind zahlreiche Störungen bekannt, die mit einer (lokalen) Überpigmentierung verbunden sind.

Bei den vorstehend genannten Erscheinungen und Erkrankungen sind die Wirkungen eingehend beschrieben, ohne daß aber die Ursachen geklärt werden

30 konnten. Die Vermutung, daß das Peptid DCoH/PCD dabei eine Rolle spielen

könnte, wurde in Bezug auf Vitiligo geäußert, jedoch nicht bewiesen. Tatsächlich deutet vieles darauf hin, daß die beobachtete Verminderung der enzymatischen Aktivität von DCoH bei milden Formen von Hyperphenylalaninämie und Vitiligo eine Folge und nicht die Ursache für diese Störungen ist.

5 Nachgewiesen wurde in den betroffenen Zellen ein Überangebot des für die Bildung von L-Tyrosin aus L-Phenylalanin notwendigen Cofaktors Tetrahydrobiopterin.

Insgesamt besteht ein Bedarf an Mitteln, die geeignet sind, Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers und damit verwandter
10 Erscheinungen zu behandeln.

Es wurde jetzt überraschend gefunden, daß DCoH/PCD geeignet ist, de novo pigmentierte Zellen zu schaffen. Dabei ist DCoH nicht Glied in der Kette der Melaninsynthese, dessen Ausfall zur Depigmentierung führt, sondern es findet
15 eine "künstliche Überexpression" statt, die die Pigmentierung auslöst. Es wurde ferner gefunden, daß DcoH-Antiserum geeignet ist, eine Pigmentierung abzuschwächen oder (deren Entstehung) zu verhindern.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen, bei dem eine physiologisch wirksame Menge des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DcoH-Antikörpern
20 als Wirkstoff in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial enthalten ist.

Das erfindungsgemäße Mittel enthält das die Pigmentierung auslösende Protein DCoH oder, alternativ oder ergänzend, die dafür codierende DNA und/oder RNA oder alternativ, DcoH-Antikörper bzw. -Antiserum als Wirkstoff.

25 Experimentell wurde der Effekt von DCoH/PCD nach der Injektion von mRNA in Oocyten gezeigt. Da die RNA in der Zelle das Produkt der Transkription der entsprechenden DNA ist, und selbst in das Protein übersetzt wird, ist die Wirksamkeit aller drei Wirkstoffe, Protein, DNA und RNA, sichergestellt, wobei gewisse Spektren bei der Stärke und Dauer der Wirkung auftreten können.
30 Protein- und Nuklein-Säure-Sequenz von DCoH und der dafür codierenden

DNA sind in US-A 5 403 712 und 5 620 887 beschrieben. Die Herstellung von Antiserum ist in Development 121, 1217 (1995) beschrieben. Im einzelnen kommen sowohl poly- wie auch monoklonale Antikörper für die erfindungsgemäßen Zwecke in Frage.

5 Das erfindungsgemäße Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen enthält den Wirkstoff in einem üblichen pharmazeutisch annehmbaren und verträglichen Trägermaterial. Solche Trägermaterialien sind sowohl für die topische als auch die parenterale Verabreichung bekannt. Möglich sind ferner gentherapeutische Verabreichungsformen, bei denen das für DCoH 10 decodierende Gen in die Zielzelle eingeführt wird. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf dem Gebiet der Protein/DNA/RNA-Therapie üblich und orientieren sich an den in den Zielzellen normalen Konzentrationen, d. h. liegen auf normaler Höhe oder darüber.

Bei der topischen Verabreichung kann das Mittel auf die Haut aufgebracht 15 werden, wobei der Wirkstoff in einem transdermal wirksamen Trägermaterial enthalten ist. Solche Trägermaterialien, die hier als Penetrationshilfe oder Penetrationsbeschleuniger ausgebildet sind und meist in Form von Liposomen vorliegen, sind bekannt. Des weiteren ist das Aufbringen mittels eines transdermalen Systems möglich und insbesondere bei der Behandlung lokaler 20 Störungen sinnvoll.

Bei der topischen Anwendung, die sich auf bestimmte Regionen oder Zellen richtet, beispielsweise bei überpigmentierten oder depigmentierten Hautpartien oder Bereichen der Behaarung, empfiehlt sich insbesondere die Verwendung von hierfür entwickelten Liposomen, wie sie von R.M. Hoffman in Journal of 25 Drug Targeting, Vol. 5 (1997), 67 beschrieben sind. Hoffman beschreibt die Haarfollikel-selektive Einbringung von Makromolekülen bishin zum aktiven Gen mit einem Zielsystem auf Basis von topisch angewendeten Liposomen auf Phosphatylcholinbasis. Das System ist anwendbar auf in Liposomen eingebrachte oder daran gebundene Melanine, Proteine, Gene und dergleichen.

30 Kationische Lipide für die intrazelluläre Abgabe von biologisch aktiven Molekülen sind ferner aus WO-A 91/16024 bekannt, wobei diese kationischen Lipide

für die topische, enterale wie auch parenterale Verabreichung von Wirkstoffen verwandt werden können.

In vielen Fällen kann es sinnvoll sein, den Wirkstoff systemisch zur Verfügung zu stellen, wie beispielsweise aus der Interferon-Therapie der multiplen 5 Sklerose oder auch zur Behandlung von Diabetes bekannt. Diese Therapien beruhen auf der gleichmäßigen Verteilung des Wirkstoffs im Körper und der dadurch ausgelösten Wirkung. Der Wirkstoff kann dabei als solcher oder auch modifiziert eingesetzt werden, d.h. in Formen, die den eigentlichen Wirkstoff erst am Zielort freisetzen. Suspensionen für die parenterale Verabreichung 10 enthalten den Wirkstoff zweckmäßigerweise ebenfalls gebunden an- oder eingeschlossen in Liposome als Transfermedium und suspendiert in einer physiologisch annehmbaren Trägerflüssigkeit.

Eine weitere systemische Darreichungsform ist beispielsweise in Form eines Nasalsprays, das den Wirkstoff auf die Schleimhäute bringt und über diese an 15 den Körper abgibt.

Eine weitere Verabreichungsmöglichkeit ist die Implantation von pro- oder eukaryotischen Organismen oder den Wirkstoff enthaltenen Trägermaterialien, welche den Wirkstoff kontinuierlich oder reguliert sezernieren.

Schließlich sei auf die Möglichkeiten der Gentherapie verwiesen, d.h. die 20 Einlagerung des Gens für DCoH/PCD in eine Zielzelle mittels DNA- oder RNA-Viren, die sich in das Genom integrieren und damit das Gen stabil einführen. Das Gen unterliegt dann der normalen Transkription und Translation in der Zelle und stellt damit eine sinnvolle Alternative zur transienten Transfektion mit dem 25 Protein oder der dafür codierenden DNA oder RNA dar. Die Viren können sich dabei lokal einlagern - siehe auch die p53-Defizienz von Melanomen - oder sich ungerichtet im Körper verbreiten. Im Stand der Technik sind hierzu modifizierte Adenoviren oder andere "Erkältungsviren" beschrieben, die als geeignete Vehikel in Frage kommen. Zur Ausschaltung einer Hyperpigmentierung können Antisense-Techniken eingesetzt werden.

Es versteht sich, daß das Protein bzw. die dafür codierende DNA und/oder RNA zur Lagerung und Vermeidung von vorzeitiger Wirkungsminderung stabilisiert werden kann. Die Stabilisierung kann durch Beimischung üblicher Zusätze erreicht werden, so z. B. Puffersubstanzen, Salzen anderer Proteine wie auch von DNA und RNA erreicht werden. Aus der molekularen Biochemie sind hierzu beispielsweise Albumin, Heringssperma, DNA, tRNA bekannt, wie auch Detergenzien (ThesitR, TritonR), Alkali- und Erdalkaliionen und dergleichen. Eine Lagerung des Mittels und/oder Wirkstoffs in getrockneter oder gefriergetrockneter Form oder nach Schockfrieren im flüssigem Stickstoff kann ebenfalls sinnvoll sein.

Das erfindungsgemäße Mittel kann den Wirkstoff selbstverständlich in modifizierter Form enthalten, d.h. als Protein, in dem einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind oder fehlen. Ebenso können in der DNA und/oder RNA Nukleotide oder Nukleotidsequenzen fehlen, ergänzt oder ausgetauscht werden. Voraussetzung ist, daß der so modifizierte Wirkstoff die von ihm verlangte Wirkung bei der Behandlung von Depigmentierungerscheinungen nach wie vor liefert. Gründe für solche Modifikationen können die Stabilisierung des Wirkstoffs, produktionstechnische oder formulierungstechnische Gründe oder auch eine Verbesserung der Wirkung oder des Wirkungsspektrums sein. In Frage kommen Mutation und Fusion nach gentechnischen oder chemischen Methoden, Fusionierungen mit N- und C-terminalen Proteinen oder Peptiden. Aus Gründen einer besseren Reinigung mittels Affinitätschromatographie können beispielsweise Histidintags oder Gst-Fusionen vorgenommen werden, oder Sequenzen eingefügt werden, um eine Dirigierung in bestimmte Zielzellen zu erleichtern - NLS-Sequenzen sind geeignet, den Wirkstoff in den Zellkern zu dirigieren. Durch Phosphorylierung oder Glykosilierung an geeigneten Resten, Modifikationen an der Phosphatgruppe der DNA oder RNA können Modifikationen vorgenommen werden, die dem Abbau durch körpereigene Nukleasen vorbeugen. Bekannt sind hier Phosphorthioatgruppen.

Zur Stabilisierung des Proteins kann es sinnvoll sein, Änderungen vorzunehmen, etwa bereits auf der Ebene der DNA/RNA, um beispielsweise Restriktionsstellen, chemische Instabilität oder Angriffspunkte von Nukleasen zu beseitigen oder die Wirkung zu verstärken oder zu spezifizieren, beispielsweise

auch, um zwischen den verschiedenen Aktivitäten des multifunktionellen Proteins zu diskriminieren und eine störende Funktion stillzulegen. Umgekehrt kann es auch sinnvoll sein, die Stabilität zu vermindern und damit die Halbwertszeit des Wirkstoffs zu verkürzen, indem Modifikationen eingeführt werden, die den protolytischen Abbau ermöglichen, etwa durch Einbau von Erkennungssequenzen für Proteasen.

Das Protein kann auf übliche Weise nach Klonierung des Gens in geeignete Vektoren rekombinant aus Bakterien oder Eukaryonten isoliert werden. Die DNA und RNA kann aus Bakterien oder Eukaryonten nach Standardmethoden erhalten werden.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Behandlung von Pigmentationsstörungen enthält den Wirkstoff in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial, das einerseits aus mehreren üblichen Bestandteilen bestehen kann. Zweckmäßigerweise enthält das Trägermaterial wiederum ein für den Wirkstoff geeignetes Transfermedium, insbesondere ein Liposom oder Virus. Das Mittel ist in erster Linie für die topische oder parenterale Verabreichung bestimmt.

Die Erfindung betrifft neben einem Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen auch die Verwendung von DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DCoH-Antikörpern bzw. -Antiserum als Wirkstoff zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers. Insbesondere werden unter Pigmentierungsstörungen Depigmentierungserscheinungen solche der Haut, Haare und der Retina verstanden, darunter insbesondere Vitiligo, Alopecia areata, sowie das vorzeitige oder altersbedingte Ergrauen des Haarwuchses und Formen von lokaler Überpigmentierung, etwa Melanodermie, Naevus und dergleichen. Die Erfindung betrifft sowohl angeborene wie erworbene Pigmentierungsstörungen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der erfindungsgemäßen DCoH, dafür kodierende DNA und/oder RNA oder DCoH-Antikörper oder -Antiserum enthaltenden Mittel liegt in der Behandlung von melanozytären Tumoren.

Melanozytäre Tumore und insbesondere auch das maligne Melanom stellen dedifferenzierte Melanozyten aus klonalem Ursprung dar.

Die Wirkung der erfindungsgemäßen Mittel auf melanozytäre Tumore geht in zweierlei Richtung. Zum einen beruht sie auf der Redifferenzierung von dedifferenzierten Melanozyten. Versuche an *Xenopusoocytes* haben gezeigt, daß DCoH die Differenzierung von Melanozyten einleitet. Die Anwendung der erfindungsgemäßen Mittel wirkt somit in Richtung auf eine Redifferenzierung und Normalisierung entarteter Zellen.

Zum anderen kann über Antikörper, Antiserum oder Antisense-RNA, gegebenenfalls auch über geeignete Mutanten der DCoH-DNA, -RNA oder des Proteins selbst, Einfluß auf die Teilung der Melanozyten genommen werden. Über die Blockierung der Wirkung des DCoH kann Einfluß auf die Teilungsgeschwindigkeit der Melanozyten bis hin zum Stillstand der Teilung und gegebenenfalls sogar zum Absterben der Zellen genommen werden.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert, wobei hinsichtlich der Materialien und Methoden ergänzend auf E. Pogge von Strandmann und G.U. Ryffel, Development 121 (1995), 1217 bis 1226 hingewiesen wird.

Beispiel 1:

Frösche der Gattung *Xenopus* wurden unter Standardbedingungen gehalten. Zur *in vitro* Befruchtung wurden 600 U Chorion Gonadotropin (Human) subkutan in den dorsalen Lymphsack geschlechtsreifer Weibchen injiziert und die Eier nach der Eiablage in Petrischalen mit intakten Spermien befruchtet. Nach 5 Minuten wurde mit 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 5 mM Hepes pH 7,8 und 2,5 mM NaHCO₃ überschichtet.

Für die Mikroinjektion wurde die Gallerthüle entfernt und dann 1,5 Minuten mit 2 % Cystein bei pH 8,0 behandelt, anschließend in Überschichtungspuffer

dreifach gewaschen. Nach der Injektion wurde bei Raumtemperatur in Überschichtungspuffer kultiviert.

Für die Injektion wurde durch in vitro Transkription aus geeigneten rekombinanten Vektoren gewonnene mRNA verwandt. Pro Ei wurden 500 pg/RNA in 5 25 nl Pufferlösung injiziert. Die dazu verwandten Glaskanülen wurden vor der Verwendung aus Kapillaren gezogen und hatten an der Spitze einen Durchmesser von nicht mehr als 30 μ m.

Die sich aus den Eiern entwickelten Embryos zeigten eine deutliche Pigmentierung, die sich früher einstellte, als bei der Kontrolle. Die Pigmentierung trat 10 zudem an Stellen auf, an denen der Embryo normalerweise nicht pigmentiert ist.

Fig. 1 zeigt Embryonen, die in der linken Bildreihe (A/C) DCoH überexprimieren. Auf der rechten Bildreihe (B/D) befindet sich die Kontrolle. Die dunklen Pigmentflecken sind in der linken Bildreihe deutlich zu erkennen. Es bezeichnen a = anima, eye = Auge, cg = cement glant.

15 DCoH/PCD induziert also ektopische Pigmentzellen. Das Ergebnis zeigt, daß DCoH/PCD allein, d.h. ohne die Melaninsynthesekette, in der Lage ist, die für die Pigmentsynthese notwendigen Schritte auszulösen.

Beispiel 2:

In diesem Beispiel wird die RNA für DCoH in Xenopus-Embryonen im 2-Zell-20 stadium in nur eine der beiden Zellen injiziert, zusammen mit der RNA für GFP, green fluorescent protein. Die Coinjektion der RNA für GFP diente der Visualisierung, daß die injizierten RNAs auch nur in den injizierten Zellen in aktives Protein translatiert werden.

In der sich aus dem zweiten Zellstadium entwickelnden Larven läßt Fig. 2 25 erkennen, daß die Pigmentierung auf eine Körperhälfte der Larve beschränkt ist, dort, wo auch die Fluoreszenz (rechte Bildreihe) sichtbar ist. DCoH/PCD ist somit geeignet, in den damit beaufschlagten Zellen eine vorzeitige und über das

normale Maß hinausgehende Pigmentierung auszulösen. Die Larven entwickelten sich, abgesehen von der Hyperpigmentierung und der Fluoreszenz normal.

Beispiel 3:

5 Nach Standardmethoden im Kaninchen gewonnenes Antiserum gegen DCoH wurde analog zu Beispiel 2 in Zellen von Fröschen der Gattung Xenopus injiziert. Fig. 3 zeigt, daß in drei Tage alten Embryonen die Pigmentbildung völlig unterdrückt ist (α -DcoH, oberes Bild), während in der Kontrolle (unteres Bild) die normale Pigmentierung auftritt.

Patentansprüche

1. Mittel zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers,

5 dadurch gekennzeichnet, daß es eine physiologisch wirksame Menge des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA oder von DcoH-Antikörpern oder -Antiserum, in einem pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterial enthält.

10 2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es das Protein DCoH enthält.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es DcoH-Antikörper enthält.

4. Mittel nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial ein den Wirkstoff transportierendes Transfermedium enthält.

15 5. Mittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transfermedium eine Liposomzubereitung oder ein Virus ist.

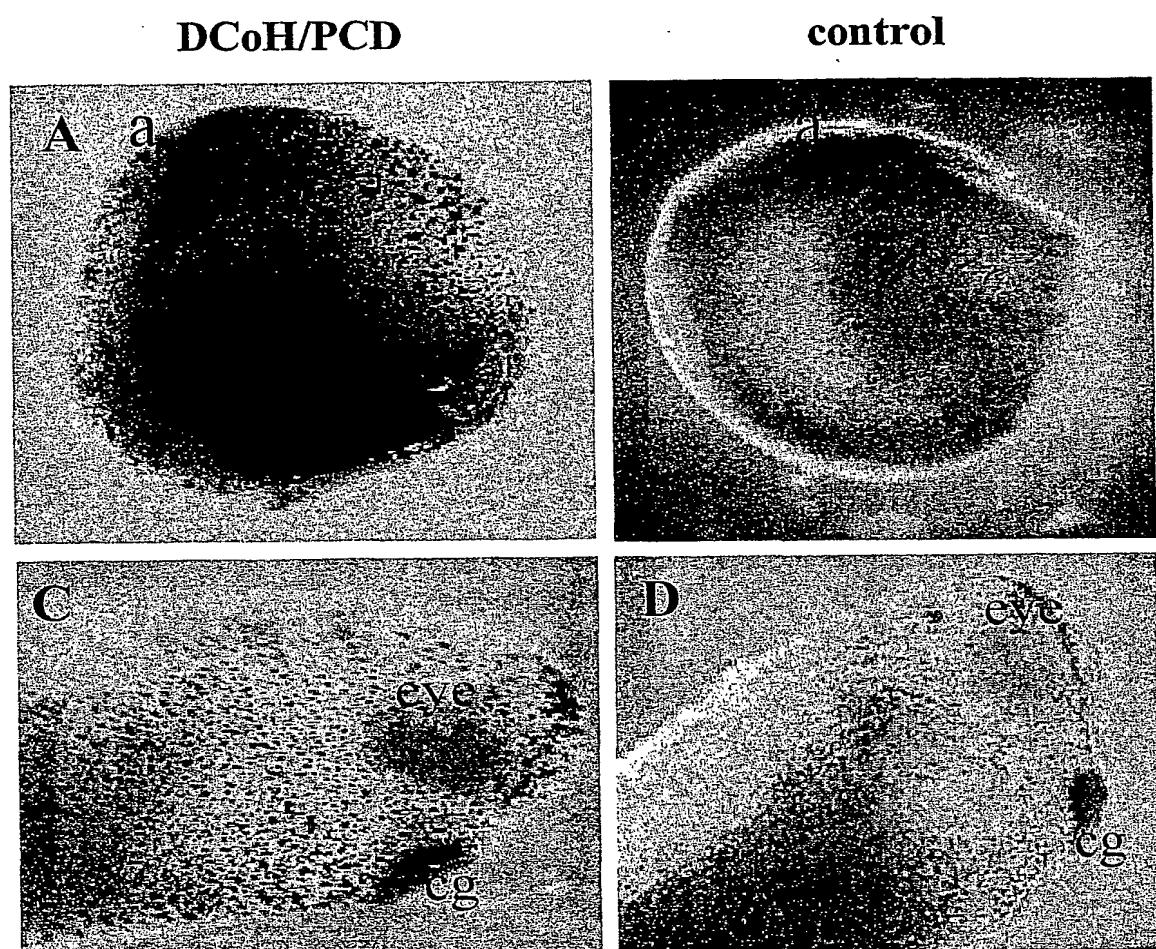
6. Mittel nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Formulierung zur topischen Anwendung vorliegt.

20 7. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Injektionsformulierung vorliegt.

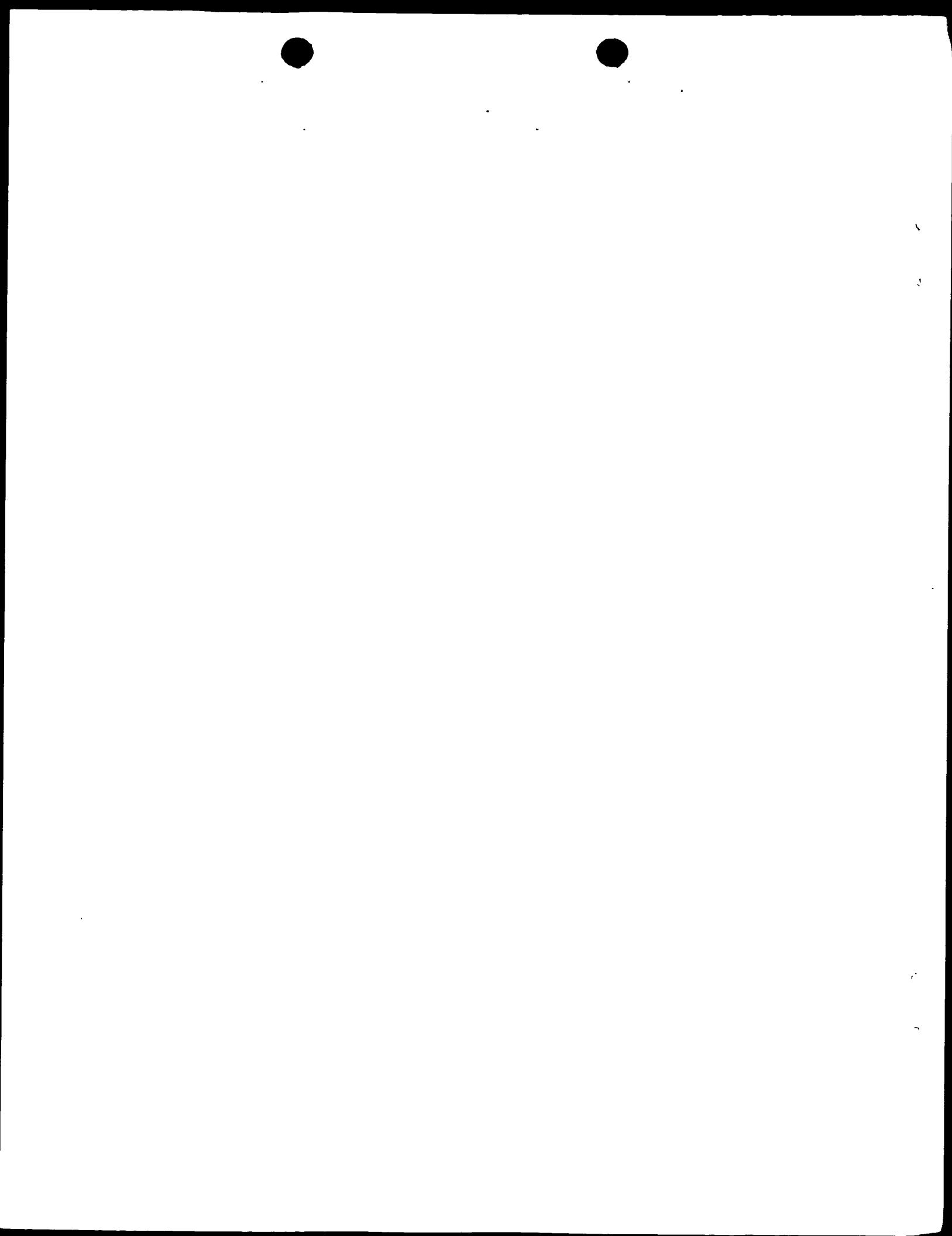
8. Mittel nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Pigmentierung oder Depigmentierung von Haut oder Haaren bestimmt ist.

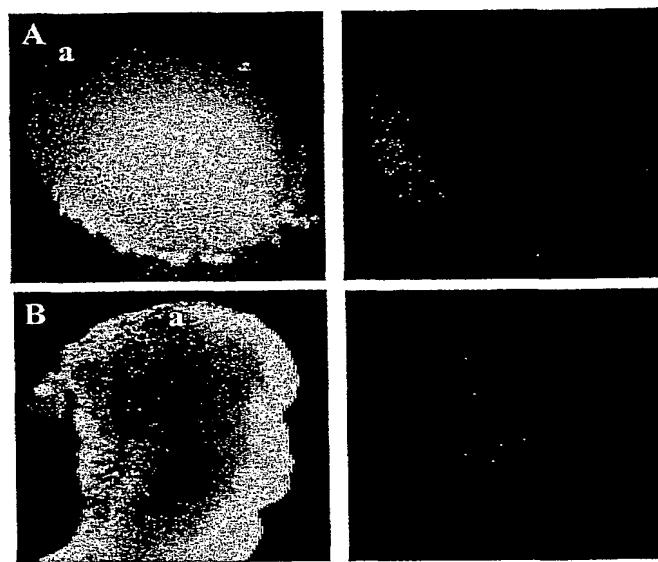
9. Mittel nach Anspruch 8, bestimmt zur Behandlung von Vitiligo,
5 Alopecia areata, und/oder Canities bzw. Melanodermie.

10. Verwendung des Proteins DCoH, der dafür codierenden DNA und/oder RNA, oder von DcoH-Antikörpern bzw. -Antiserum, als Wirkstoff zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Behandlung von Pigmentierungsstörungen des menschlichen und tierischen Körpers.

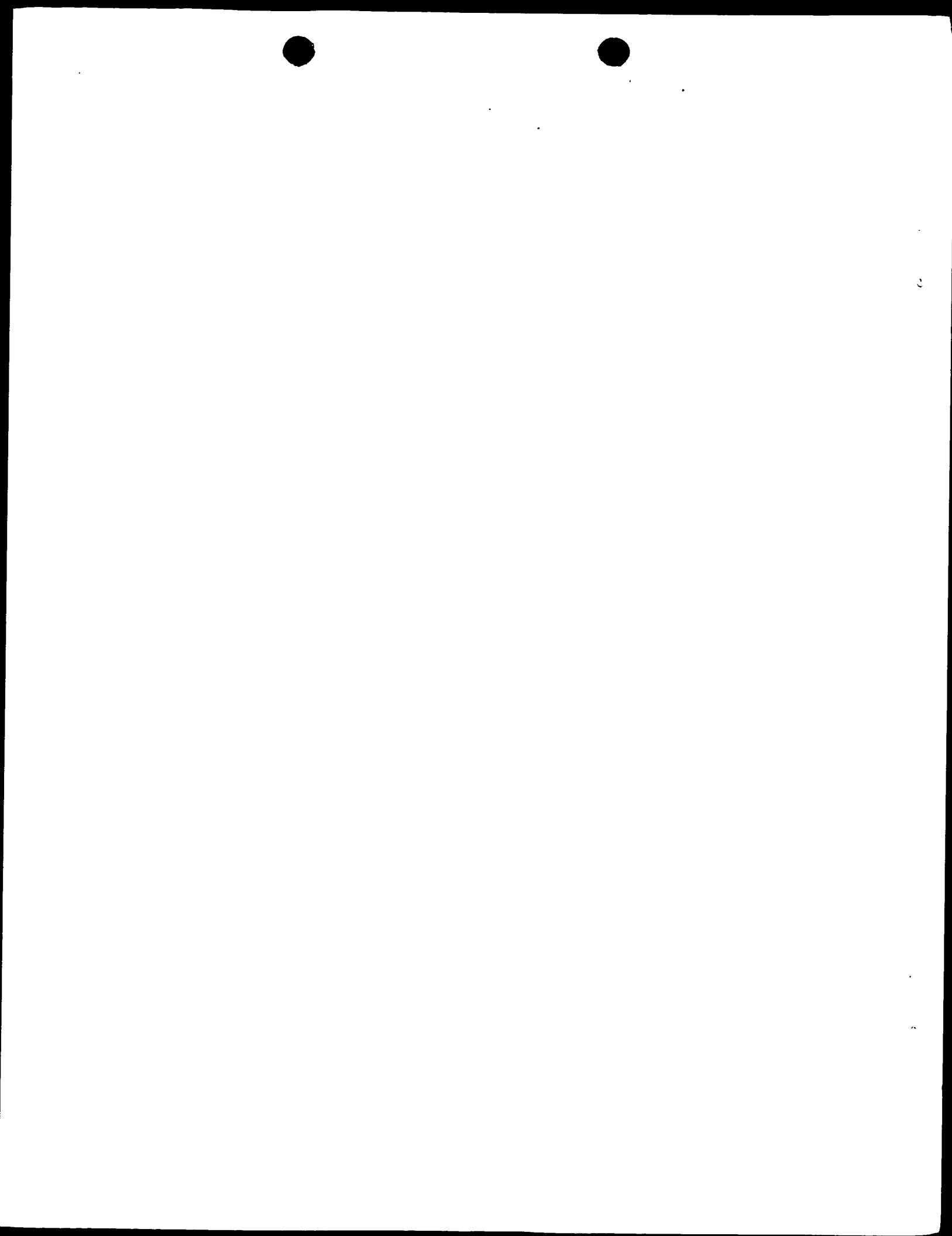


Figur 1

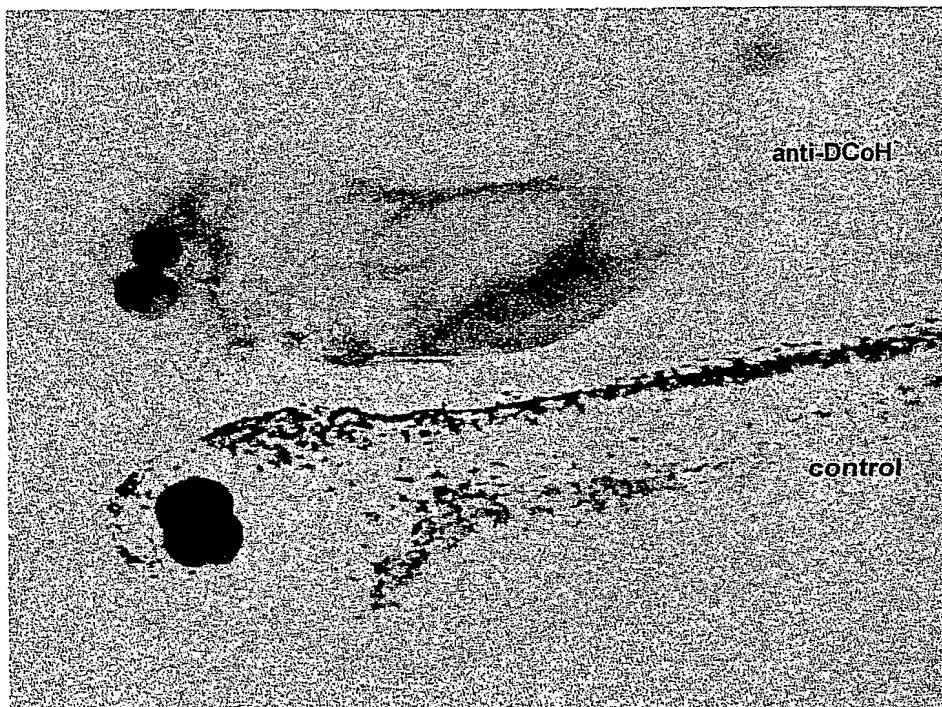




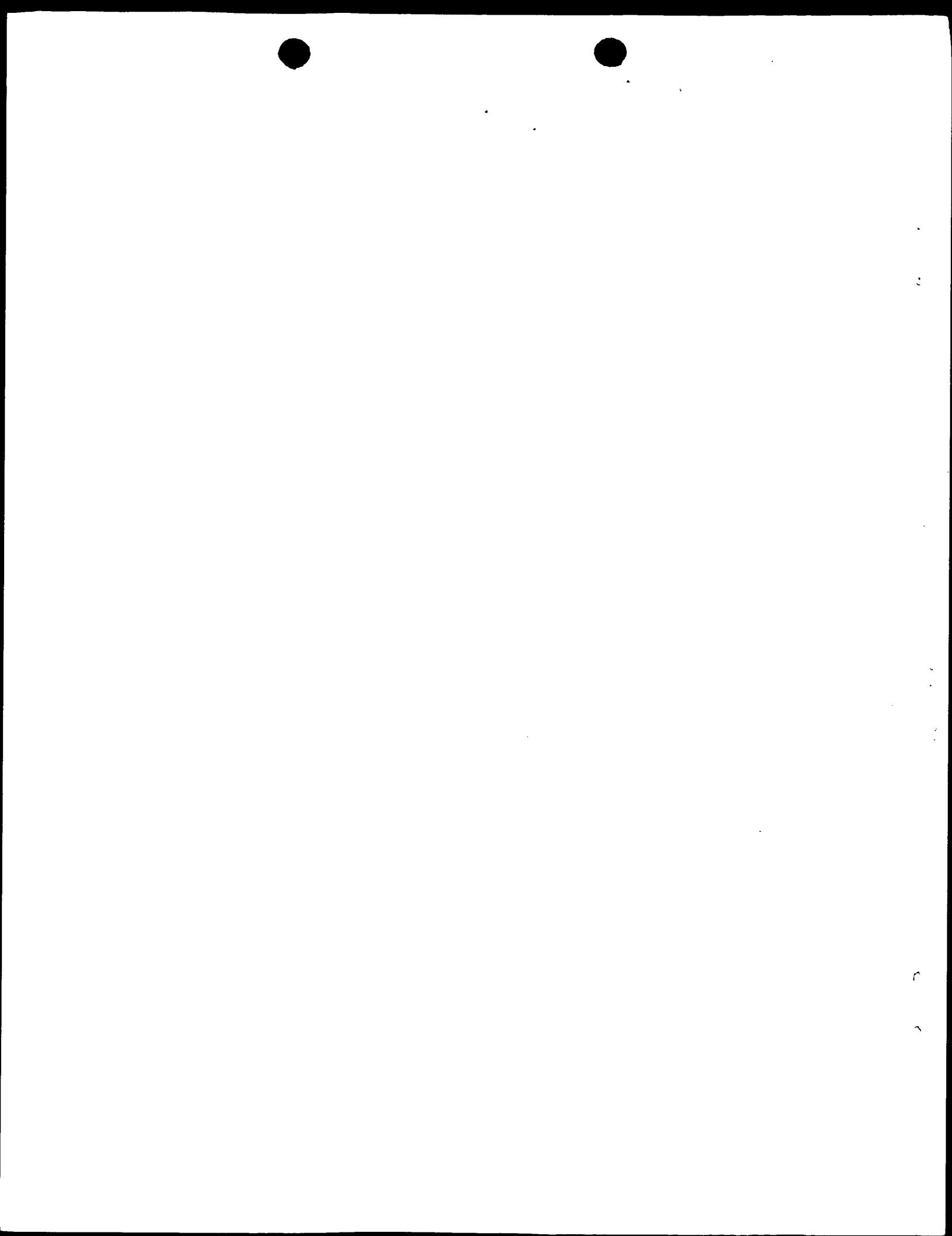
Figur 2



3 / 3



Figur 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP 00/01822A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/52 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/00 A61K38/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHALLREUTER KARIN U ET AL: "Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1226, no. 2, 1994, pages 181-192, XP000946158 ISSN: 0006-3002 the whole document ----- -/-	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 September 2000

Date of mailing of the international search report

29/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 00/01822

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: "The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis." INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 42, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 53-59, XP000946178 ISSN: 0214-6282 the whole document	1, 3
A	LI LINGNA ET AL: "Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice." JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE, vol. 14, no. 2, 1997, pages 101-108, XP000946174 ISSN: 0923-1811 the whole document	4-6
T	V STRANDMANN ELKE POGGE ET AL: "Ectopic pigmentation in Xenopus in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 91, no. 1-2, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 53-60, XP000946160 ISSN: 0925-4773 the whole document	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01822

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/52 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/00 A61K38/51

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHALLREUTER KARIN U ET AL: "Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1226, Nr. 2, 1994, Seiten 181-192, XP000946158 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument ----- -/-	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. September 2000

29/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01822

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: "The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis." INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 42, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 53-59, XP000946178 ISSN: 0214-6282 das ganze Dokument	1,3
A	LI LINGNA ET AL: "Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice." JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE, Bd. 14, Nr. 2, 1997, Seiten 101-108, XP000946174 ISSN: 0923-1811 das ganze Dokument	4-6
T	V STRANDMANN ELKE POGGE ET AL: "Ectopic pigmentation in Xenopus in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, Bd. 91, Nr. 1-2, 1. März 2000 (2000-03-01), Seiten 53-60, XP000946160 ISSN: 0925-4773 das ganze Dokument	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K38/52 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/00 A61K38/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHALLREUTER KARIN U ET AL: "Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo." <i>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA</i>, vol. 1226, no. 2, 1994, pages 181-192, XP000946158 ISSN: 0006-3002 the whole document</p> <p style="text-align: center;">— —/—</p>	1-10

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

18 September 2000

29/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/01822

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: "The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis." INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 42, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 53-59, XP000946178 ISSN: 0214-6282 the whole document</p> <p>—</p> <p>LI LINGNA ET AL: "Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice." JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE, vol. 14, no. 2, 1997, pages 101-108, XP000946174 ISSN: 0923-1811 the whole document</p> <p>—</p> <p>V STRANDMANN ELKE POGGE ET AL: "Ectopic pigmentation in Xenopus in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 91, no. 1-2, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 53-60, XP000946160 ISSN: 0925-4773 the whole document</p> <p>—</p>	1,3
A		4-6
T		1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen
PCT/EP 00/01822

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K38/52 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/00 A61K38/51

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SCHALLREUTER KARIN U ET AL: "Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1226, Nr. 2, 1994, Seiten 181-192, XP000946158 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1-10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipielle oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Abschiedsdatum des internationalen Recherchenberichts

18. September 2000

29/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: "The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY,</p> <p>Bd. 42, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 53-59, XP000946178</p> <p>ISSN: 0214-6282</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>—</p>	1,3
A	<p>LI LINGNA ET AL: "Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice."</p> <p>JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE,</p> <p>Bd. 14, Nr. 2, 1997, Seiten 101-108, XP000946174</p> <p>ISSN: 0923-1811</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>—</p>	4-6
T	<p>V STRANDMANN ELKE POGGE ET AL: "Ectopic pigmentation in Xenopus in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase."</p> <p>MECHANISMS OF DEVELOPMENT,</p> <p>Bd. 91, Nr. 1-2, 1. März 2000 (2000-03-01), Seiten 53-60, XP000946160</p> <p>ISSN: 0925-4773</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>—</p>	1-10

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 20 October 2000 (20.10.00)	Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
International application No. PCT/EP00/01822	Applicant's or agent's file reference pggs0003 ch
International filing date (day/month/year) 22 February 2000 (22.02.00)	Priority date (day/month/year) 25 February 1999 (25.02.99)
Applicant POGGE VON STRANDMANN, Elke	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

25 September 2000 (25.09.00)

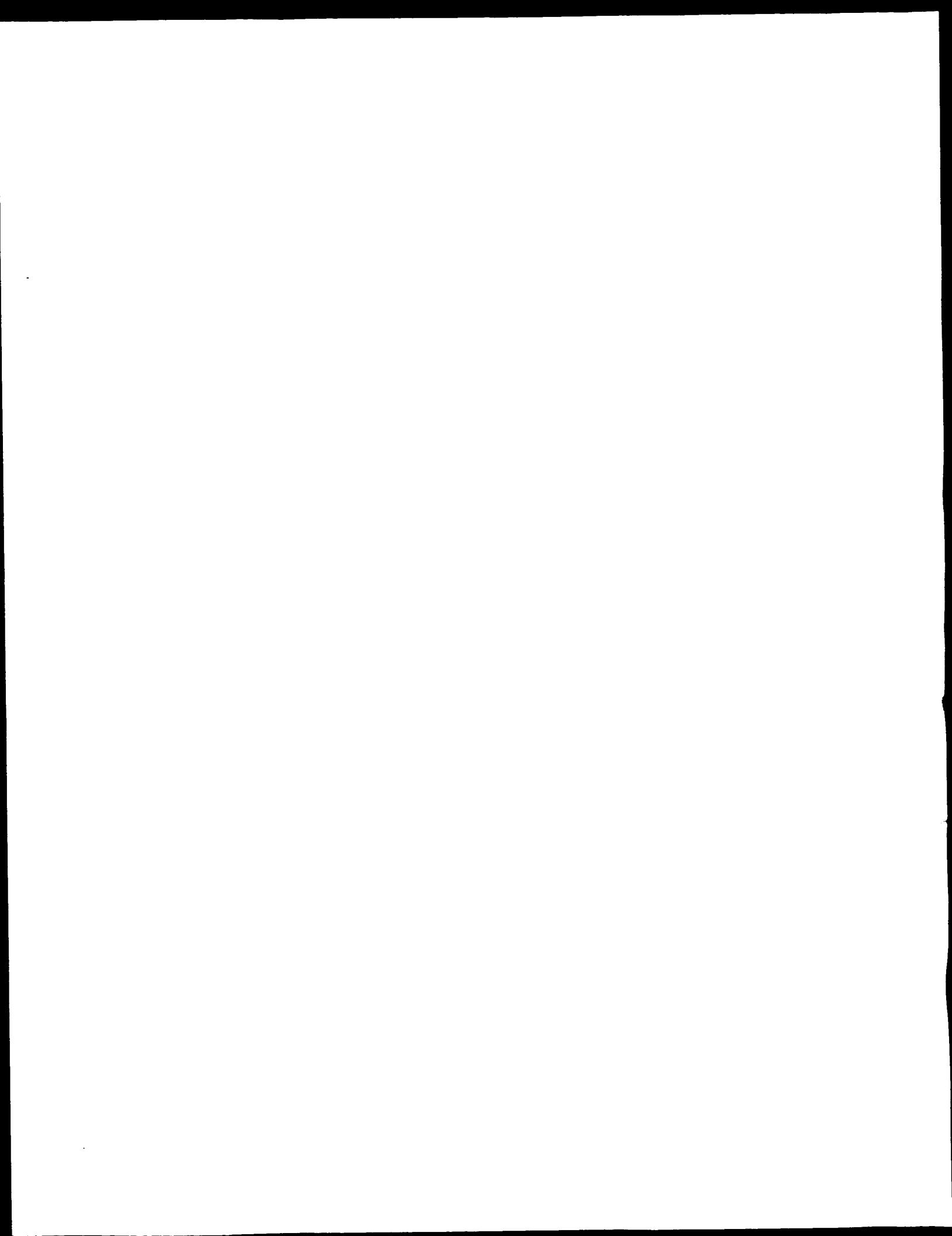
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Manu Berrod
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference pggs0003 ch	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/01822	International filing date (day/month/year) 22 February 2000 (22.02.00)	Priority date (day/month/year) 25 February 1999 (25.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/52		
Applicant POGGE VON STRANDMANN, Elke		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

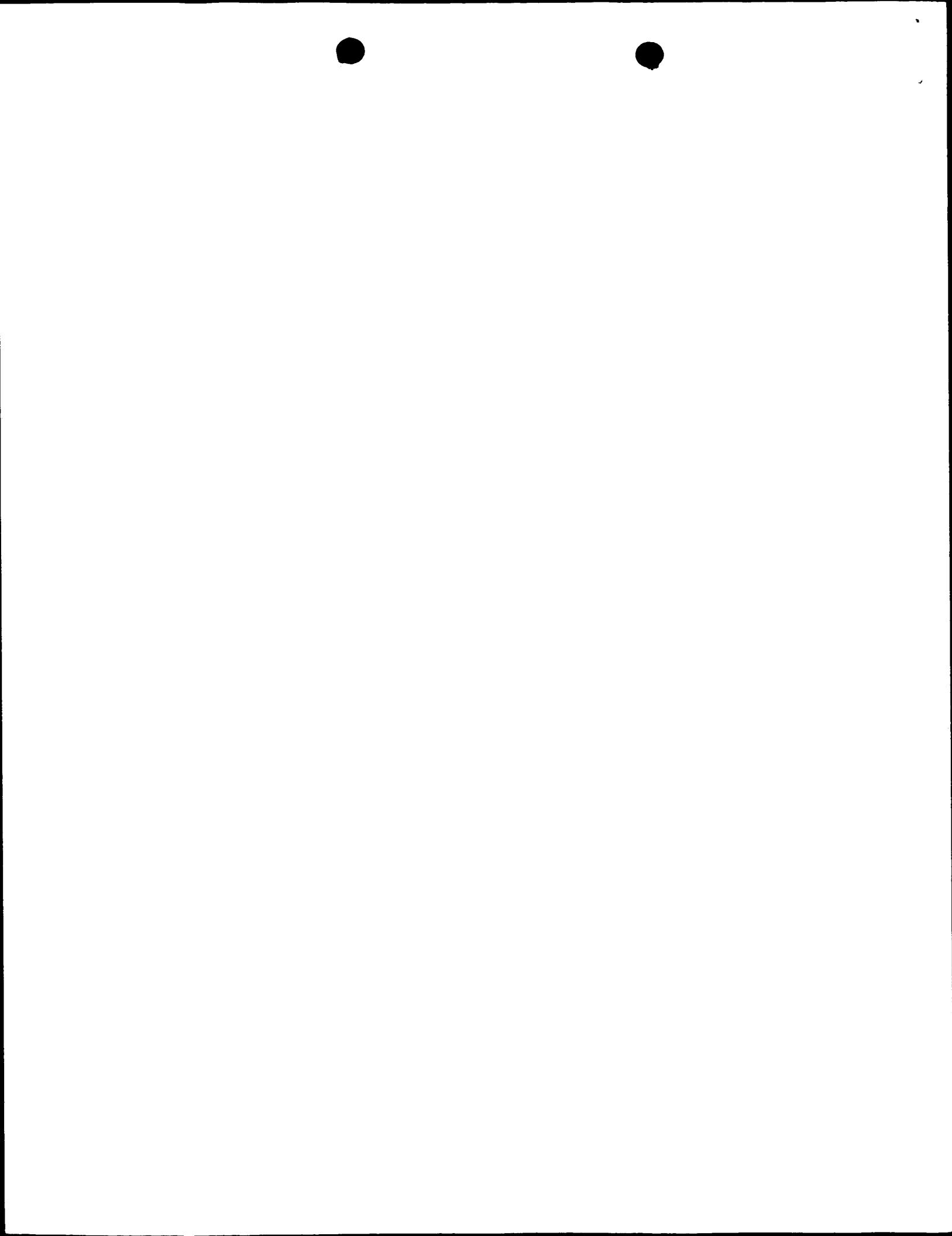
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 September 2000 (25.09.00)	Date of completion of this report 14 November 2000 (14.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/01822

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-10, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____.

the claims, Nos. 1-10, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of _____,

Nos. _____, filed with the letter of _____.

the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

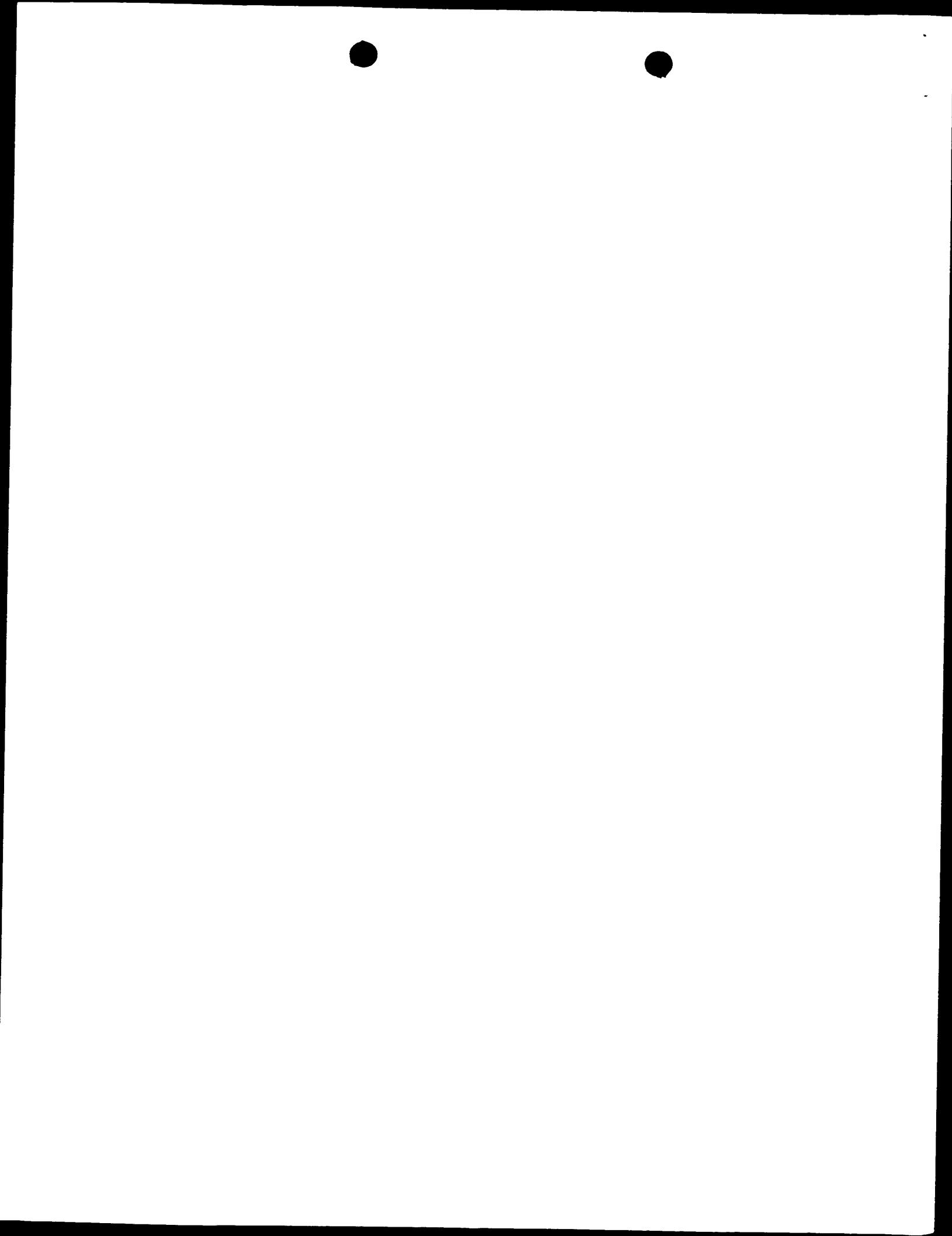
the description, pages _____

the claims, Nos. _____

the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/01822

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. _____

because:

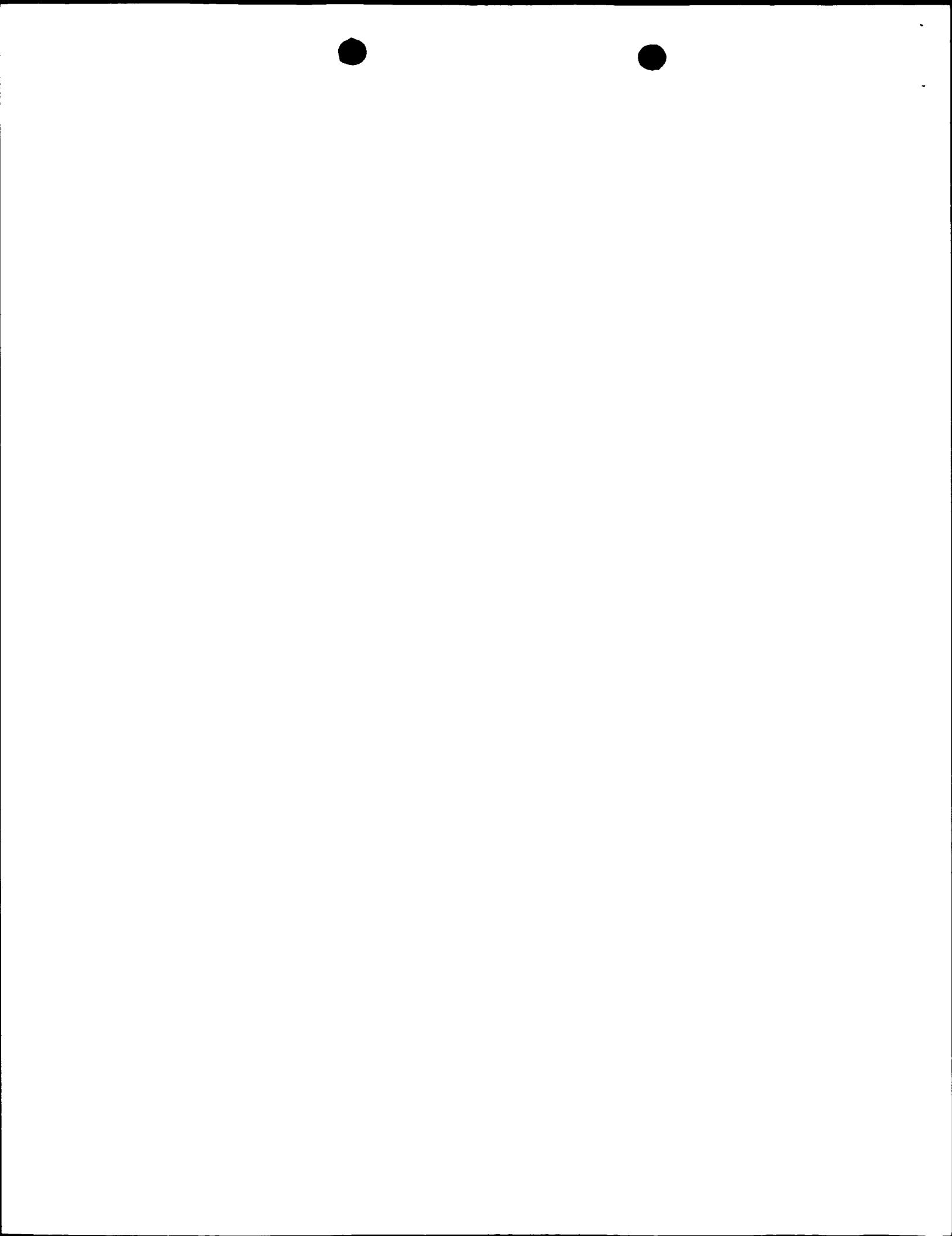
the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet.

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

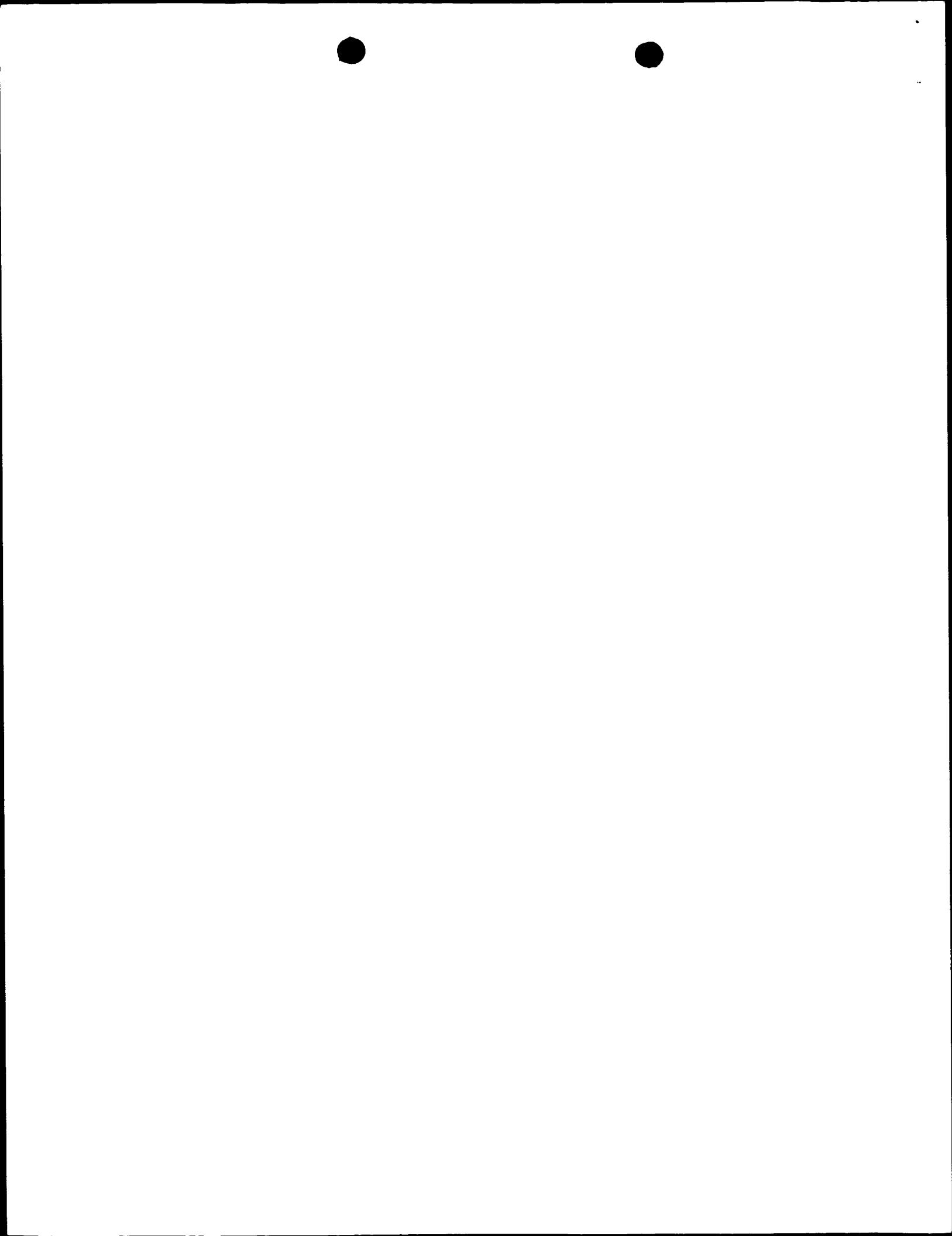


INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/01822**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

In the opinion of the International Preliminary Examining Authority, Claims 1 - 10 relate to subject matter which falls within PCT Rule 67.1(iv). Consequently, an opinion with regard to the industrial applicability of the subject matter of these claims has not been established (PCT Article 34(4)(a)(i)).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/01822**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 10	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 10 : See the Supplemental Box.	YES
	Claims		NO

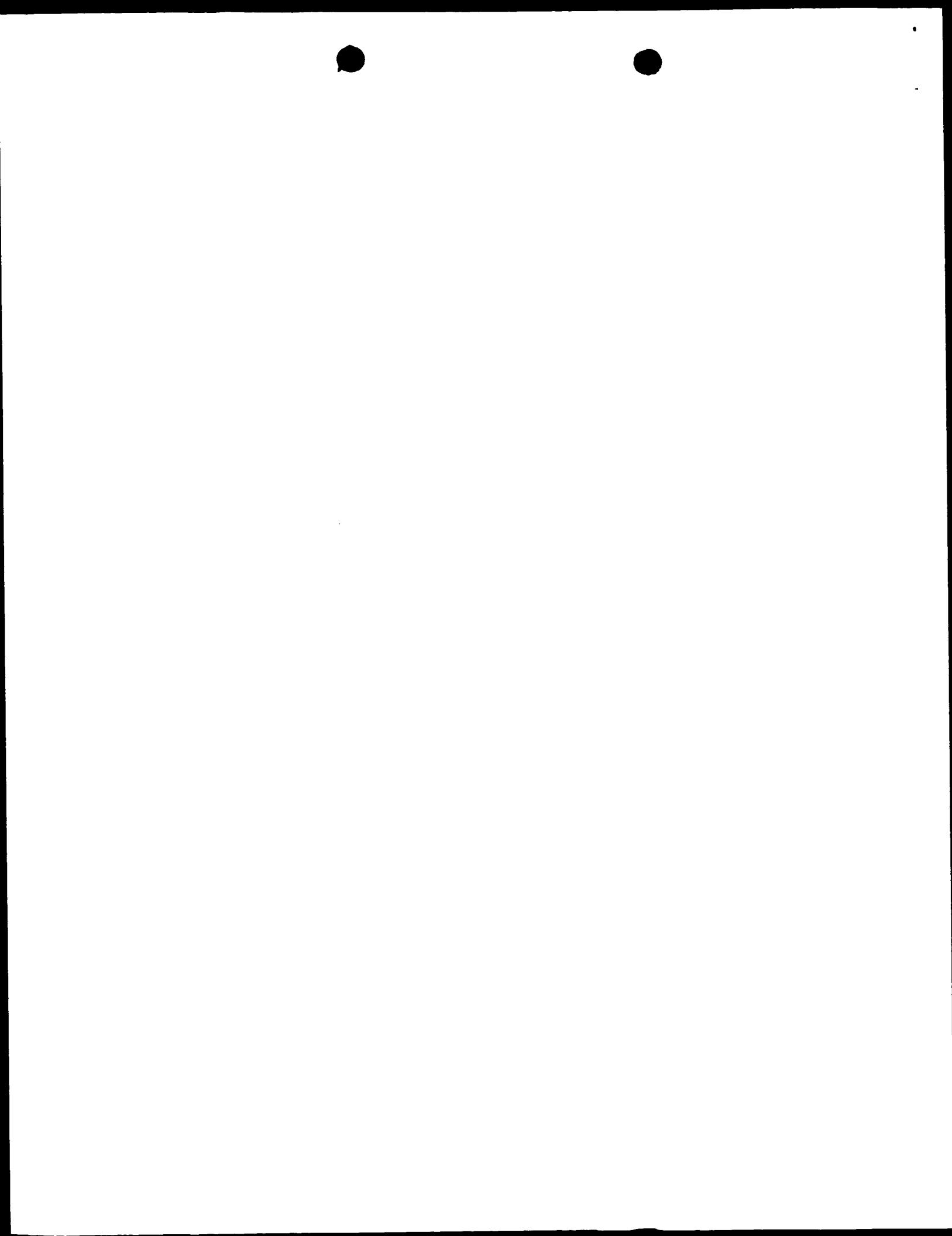
2. Citations and explanations**Citations**

D1: SCHALLREUTER KARIN U ET L: 'Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo.' BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Vol. 1226, No. 2, 1994, pages 181 - 192, XP000946158

D2: STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: 'The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis.' INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol. 42, No. 1, January 1998 (1998-01), pages 53 - 59, XP000946178

The problem to be solved by the invention is understood to be to provide an alternative use of DCoH. D1 (see p. 191, left-hand column, first paragraph and right-hand column, last sentence) discloses that the peptide DCoH/PCD possibly plays a role in vitiligo. D2 discloses a similar connection and, in addition, that DCoH is found in the pigmented epithelium of the eye (see the abstract). These indications in the prior art do not suffice, however, to

....



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

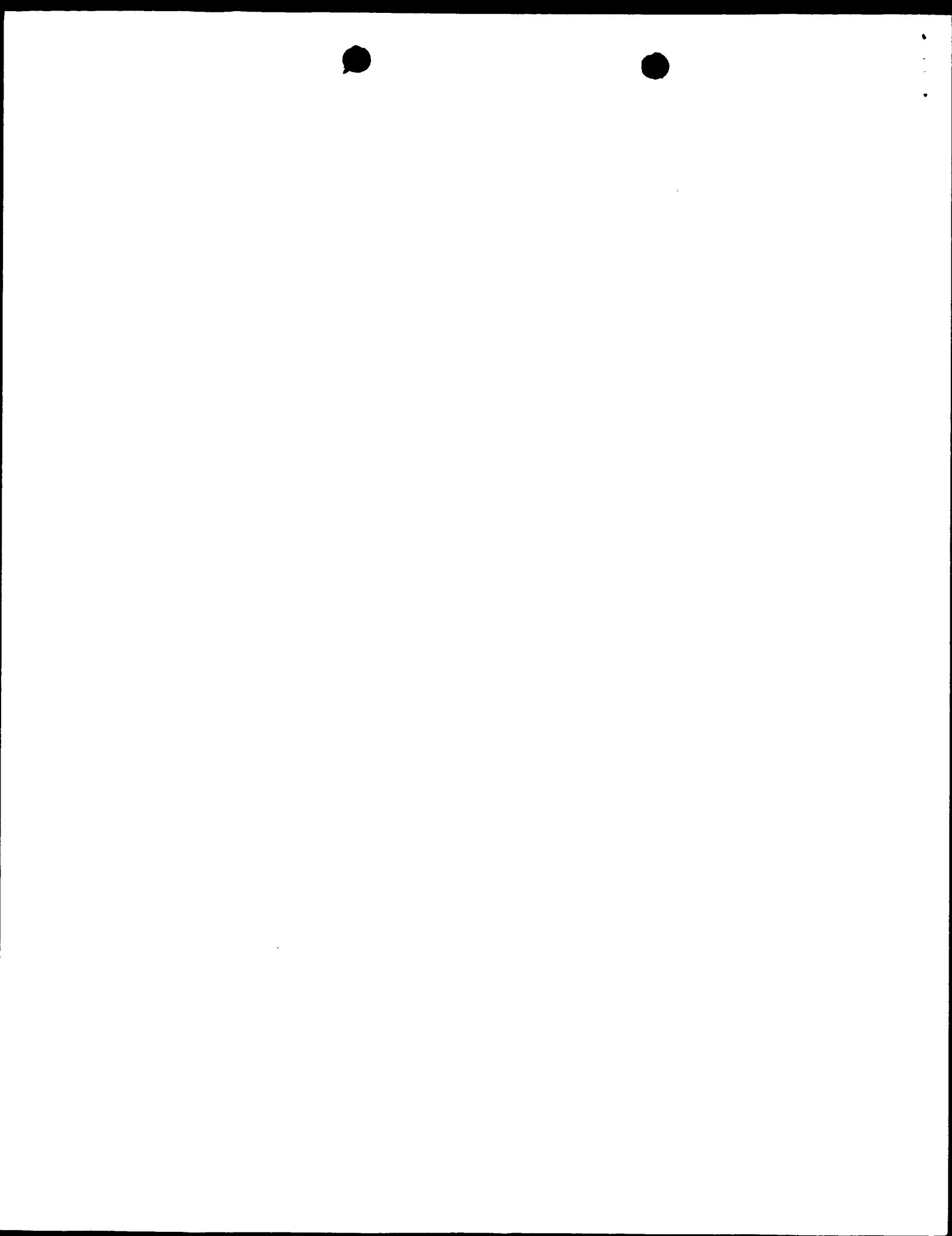
International application No.

PCT/EP 00/01822

(Continuation of V.2)

enable a person skilled in the art to solve the problem by simple routine experimentation.

The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 1 - 10 in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

REC'D 16 NOV 2000

PCT

16 NOV 2000

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

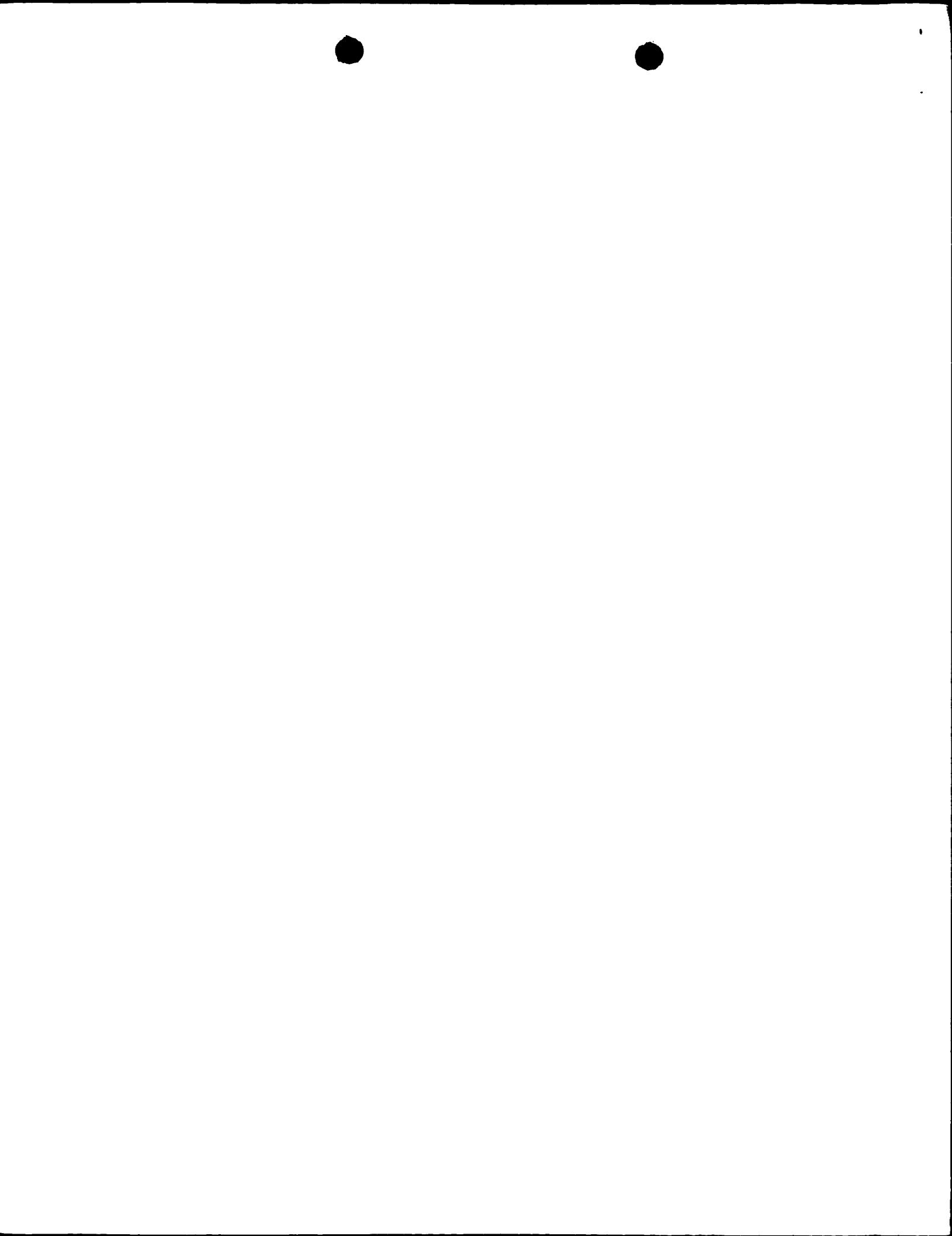
(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T 17

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts pggs0003 ch	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01822	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 25/02/1999
<p>Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/52</p> <p>Anmelder POGGE VON STRANDMANN, Elke</p> <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung 		

Datum der Einreichung des Antrags 25/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 14.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Laffargue-Haak, T Tel. Nr. +49 89 2399 8009





INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01822

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-10 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

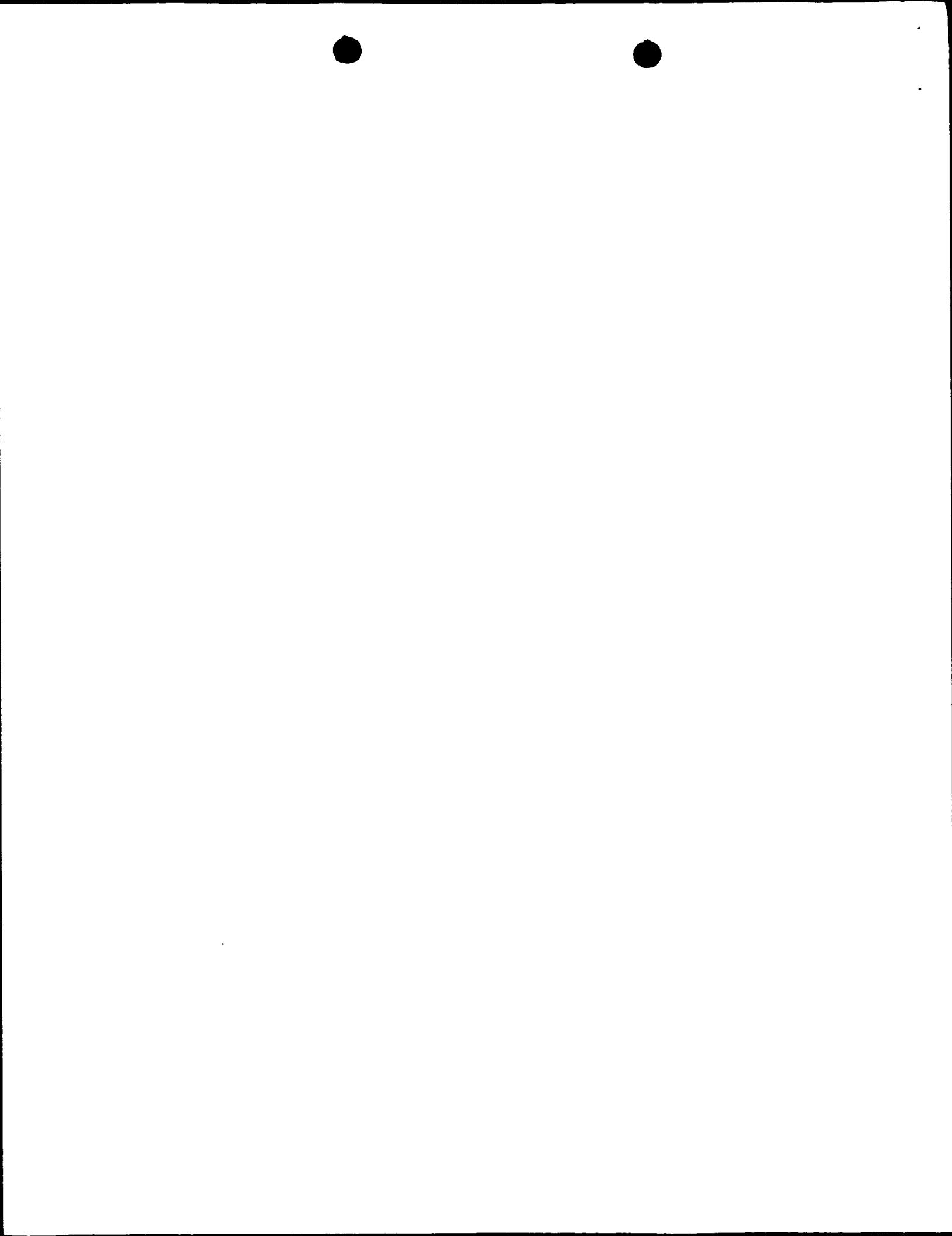
Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01822

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.
 Ansprüche Nr. .

Begründung:

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01822

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-10
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-10
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-10 : siehe Beiblatt
	Nein: Ansprüche

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**



IN III Keine Erstellung eines Gutachtens über gewerbliche Anwendbarkeit

Die Ansprüche 1-10 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit

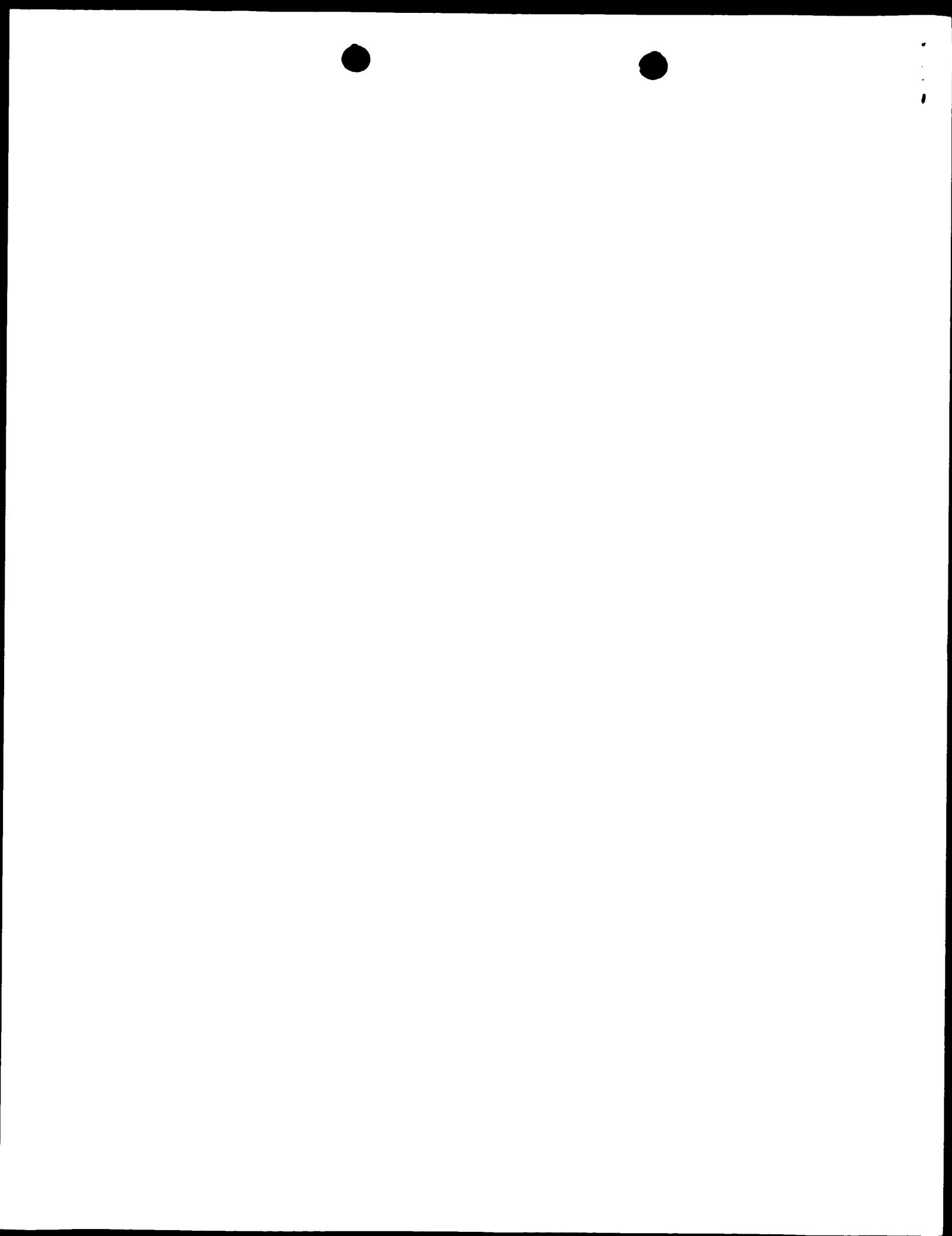
Die zulösende Aufgabe der Erfindung kann darin gesehen werden alternative Verwendung von DCoH bereitzustellen. D1 (siehe p. 191, linker Spalte, erste Absatz & rechtser Spalte, letzter Satz) offenbart, daß das Peptid DCoH/PCD möglicherweise eine Rolle spielt bei Vitiligo. D2 offenbart einen ähnlichen Zusammenhang und zusätzlich daß DCoH im pigmentierten Epithel des Auges (siehe Zusammenfassung) gefunden ist. Diese Anweisungen im Stand der Technik sind jedoch nicht ausreichend für den Fachmann um mit einfacher und routinemäßiger Prüfung der Aufgabe zu lösen.

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-10 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zitierte Dokumente

D1: SCHALLREUTER KARIN U ET AL: 'Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo.' BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1226, Nr. 2, 1994, Seiten 181-192, XP000946158

D2: STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: 'The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis.' INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 42, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 53-59, XP000946178



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts ppgs0003 ch	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 01822	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/02/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 25/02/1999
Anmelder POGGE VON STRANDMANN, Elke		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01822

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/52 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/00 A61K38/51

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SCHALLREUTER KARIN U ET AL: "Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1226, Nr. 2, 1994, Seiten 181-192, XP000946158 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. September 2000

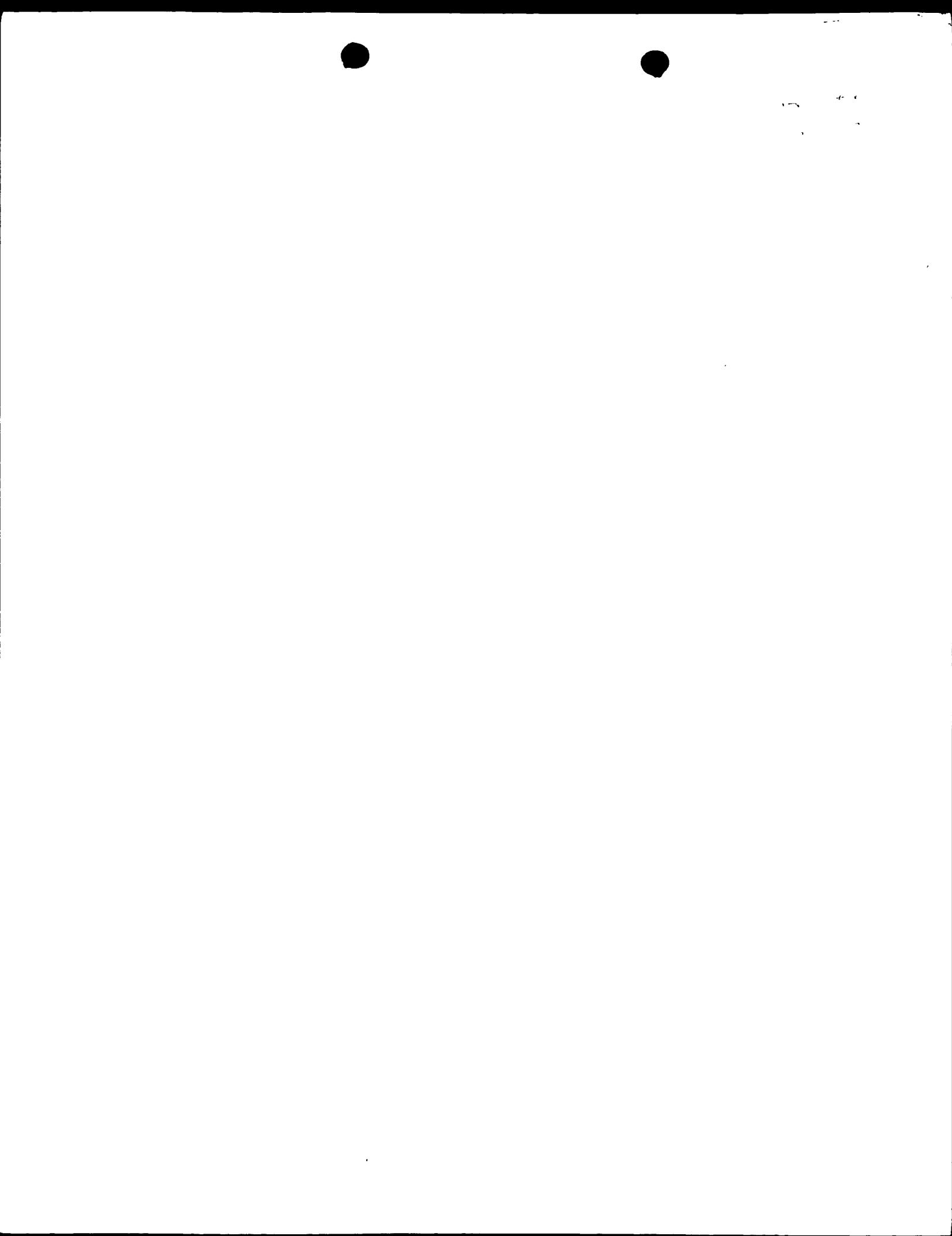
29/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>STRANDMANN ELKE POGGE V ET AL: "The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis." INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 42, Nr. 1, Januar 1998 (1998-01), Seiten 53-59, XP000946178 ISSN: 0214-6282 das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>LI LINGNA ET AL: "Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice." JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE, Bd. 14, Nr. 2, 1997, Seiten 101-108, XP000946174 ISSN: 0923-1811 das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>V STRANDMANN ELKE POGGE ET AL: "Ectopic pigmentation in Xenopus in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, Bd. 91, Nr. 1-2, 1. März 2000 (2000-03-01), Seiten 53-60, XP000946160 ISSN: 0925-4773 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1,3
A		4-6
T		1-10

